

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**

**Autarquia associada à Universidade de São Paulo**

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM MATERIAL  
DE REFERÊNCIA DE PEIXE**

**JOÃO CRISTIANO ULRICH**

**Tese apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do Grau de  
Doutor em Ciências na Área de  
Tecnologia Nuclear – Materiais.**

**Orientador:  
Prof. Dr. Jorge Eduardo de Souza Sarkis**

**SÃO PAULO**

**2011**

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho aos meus pais Tereza e Alcides (in memoriam) e principalmente aos meus grandes amores desta vida: Cris, pelo companheirismo, paciência, amizade e amor a mim dedicados e ao meu filho Matheus, que com apenas dois anos já me fez entender e repensar vários assuntos na vida!!

## **Agradecimentos**

- Ao Ipen, pela oportunidade de realização deste trabalho;
- Dr. Jorge Sarkis, pela orientação e apoio na execução do trabalho;
- Aos grandes amigos Marcos Hortellani e Helena Miho, que sem a ajuda dos mesmos as análises por meio da técnica de Absorção Atômica nunca seriam realizadas e esse trabalho não seria concluído;
- Aos bolsistas e estagiários do laboratório: Daniele, Talita, Ernesto, Gustavo, Isabella, João Carlos, Adriana, Patrícia, Newton, Karen, Marcio Pereira, Renata Muller, pela colaboração, paciência e apoio em todos os momentos deste trabalho;
- Solange Mitani, pelos inúmeros cafés e “bate-papos”;
- Dra. Vera Ponçano, pela colaboração e oportunidade de realizar o trabalho;
- A empresa Ecomar, sediada em Vigia – Pará, pela doação dos peixes;
- Dra. Vera Maihara, do CRPq - Ipen, pelas discussões e ajuda no andamento do trabalho;
- Ao CEAP – Centro de exames, análises e pesquisas, do Instituto de Criminalística de São Paulo, pelo empréstimo de um liofilizador, no qual todas as amostras de peixe foram preparadas;
- A Dilza Mantovani, do ITAL, pela etapa de homogeneização no material;
- Dr. Paulo Rela e Msc. Yasco, responsáveis pela irradiação no CTR – Ipen;
- Dra Maria Alice Góes, do CETEM-RJ, pela sugestão de referências bibliográficas sobre estudo de homogeneidade;
- Dra Marycel e toda equipe do LAQA – CQMA, pelas determinações realizadas;
- Dr. Edson Moreira, do CRPq, pelas determinações realizadas;
- Mauricio Kakazu pela colaboração nas discussões;
- Dra. Susy F. Sabato, do CTR, pela atenção e colaboração;
- Gislene, responsável pela secretaria da Pós-Graduação do Ipen, pela colaboração e elucidação de dúvidas quanto a documentos necessários para conclusão do trabalho;
- A todos familiares e amigos, que de alguma forma contribuíram para a realização e conclusão deste trabalho.

# PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM MATERIAL DE REFERÊNCIA DE PEIXE

João Cristiano Ulrich

## RESUMO

Os materiais de referência certificados (MRCs) desempenham importante papel na obtenção de resultados de medições rastreáveis ao Sistema Internacional de Unidades (SI), por meio de uma cadeia contínua de comparações. Dessa forma, a demanda por novos materiais de referência certificados (MRC) aumenta a cada dia em todas as áreas do conhecimento.

A disponibilidade de materiais de referência, principalmente no Brasil, ainda é incipiente, face a demanda que excede em muito a variedade disponível desses materiais. Entre as diversas áreas carentes de materiais de referência, destaca-se a área de alimentos pela importância desses produtos na balança comercial do país. A certificação de produtos alimentícios, destinados tanto para exportação como para o consumo interno, requer metodologias de análise que ofereçam resultados precisos e exatos a fim de assegurar a qualidade do produto.

Este trabalho descreve a produção e certificação de um material de referência na matriz peixe em mercúrio e metilmercúrio. O estudo reúne desde a etapa de seleção do material, preparação, desenvolvimento dos estudos de homogeneidade e estabilidade e a caracterização. A certificação foi realizada por meio de medições utilizando duas técnicas analíticas, a Espectrofotometria de Absorção Atômica (AAS) com sistema de injeção em fluxo e geração de vapor frio (FIA-CV-AAS) e a Diluição Isotópica aplicada a Espectrometria de Massas (IDMS), sendo este um método primário.

Neste trabalho as normas da série ISO 30 (ABNT 30–34) e ISO Guide 35 foram utilizadas como base para a preparação e caracterização do material. Para o cálculo de incertezas foi utilizado o GUM e o guia Eurachem. Como resultado, foi produzido e certificado um lote do material em relação ao teor de mercúrio ( $\text{Hg} = 0,271 \pm 0,057 \mu\text{g g}^{-1}$ ) e metilmercúrio ( $\text{MeHg} = 0,245 \pm 0,038 \mu\text{g g}^{-1}$ ), além de valores informativos de chumbo e arsênio.

# **PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF THE FISH REFERENCE MATERIAL**

**João Cristiano Ulrich**

## **ABSTRACT**

The certified reference materials (CRMs) play an important role in obtaining measurement results traceable to the International System of Units, through an unbroken chain of comparisons. Thus, the demand for new certified reference materials (CRMs) increases every day in all areas of knowledge.

The availability of reference materials, mainly in Brazil is still incipient, given that the demand far exceeds the available variety of these materials. The amount of certified reference materials available in the country is insufficient to meet the need of the scientific community and demands for development of new methodologies. Among the many areas in need of reference materials, we highlight the importance for the food trade balance for these products within the country. The certification of food products, intended both for export and for domestic consumption, requires analysis methods that provide precise and accurate results to ensure product quality.

This paper describes the preparation and certification of a reference material in the fish matrix in mercury and methylmercury. The study brings together since the stage of material selection, preparation, development of homogeneity and stability studies and characterization. The certification was performed by means of measurements using two analytical techniques, flow injection analysis - cold vapor atomic absorption spectrometry (FIA-CV-AAS) and isotope dilution applied to mass spectrometry (IDMS), which is a primary method.

In this work the standards of the ISO 30 (ABNT 30-34) and ISO Guide 35 was used as the basis for the preparation and characterization of the material. For the calculation of uncertainties was used the GUM and Eurachem guide. As a result, was produced and certified a lot of material in relation to the concentration of mercury ( $\text{Hg} = 0.271 \pm 0.057 \text{ mg g}^{-1}$ ) and methylmercury ( $\text{MeHg} = 0.245 \pm 0.038 \text{ mg g}^{-1}$ ), and informational values of lead and arsenic .

## SUMÁRIO

	Página
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2 OBJETIVOS</b>	5
<b>3 RELEVÂNCIA</b>	6
<b>4 CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS</b>	9
4.1 Histórico dos Materiais de Referência segundo o NIST	9
4.2 Produção e distribuição de materiais de referência no Brasil	11
4.3 Produção de um MRC	12
6.2.1 Seleção do material e processamento	13
4.4 Caracterização do material candidato a material de referência certificado	13
4.4.1 Estudo de homogeneidade	13
4.4.2 Estudo de estabilidade	18
4.4.3 Caracterização	24
4.4.3.1 Preparação do relatório de certificação e do certificado	24
4.5 Importância do elemento mercúrio	26
4.6 Método analítico utilizado nos estudos de homogeneidade e estabilidade do material candidato a MRC	27
4.6.1 Espectrofotometria de Absorção Atômica	27
4.6.2 Geração de vapor frio acoplado ao espectrofotômetro de absorção atômica (CVAAS).	29
4.7 Seleção do método analítico utilizado na certificação do material candidato a MRC	30
4.7.1 O Espectrômetro de Massas com Fonte de Plasma Indutivo (ICP-MS)	30
4.7.2 Diluição isotópica aplicada a espectrometria de massas (IDMS)	31
<b>5 CONSIDERAÇÕES SOBRE INCERTEZA ASSOCIADA AOS PROCESSOS DE MEDIÇÃO</b>	35

5.1	Incerteza associada ao processo de medição por meio da técnica FIA-CV-AAS	36
5.1.1	Análise das fontes de incerteza	38
5.1.2	Quantificação das incertezas, cálculo da incerteza combinada e expandida	43
5.2	Incerteza associada ao processo de medição por meio da técnica IDMS	43
5.2.1	Análise das fontes de incerteza	44
5.2.2	Quantificação das incertezas, cálculo da incerteza combinada e expandida	46
5.3	Incerteza do valor certificado	47
5.3.1	Estimativa da incerteza padrão da homogeneidade entre frascos	47
5.3.2	Estimativa da incerteza padrão devidas à estabilidade	48
<b>6</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	49
6.1	Seleção do material	49
6.2	Processamento	50
6.2.1	Recebimento e preparação do material	50
6.3	Certificação do material	52
6.3.1	Estudo de homogeneidade	52
6.3.2	Estudo de estabilidade	53
6.3.3	Descrição dos procedimentos analíticos utilizados para determinação de Hg total e MeHg	54
6.3.3.1	Determinação de mercúrio total (Hg total) por FIA-CV-AAS	54
6.3.3.2	Determinação de metilmercúrio (MeHg) por FIA-CV-AAS	54
6.4	Caracterização através da técnica de diluição isotópica aplicada à espectrometria de massas	56
6.4.1	Calibração do traçador isotópico de mercúrio e preparação das misturas padrão + traçador	57
6.4.2	Calibração do traçador isotópico de chumbo e preparação das misturas padrão + traçador	60
6.4.3	Preparação das amostras do material candidato a material de referência certificado com adição dos traçadores	62
6.5	Procedimentos analíticos utilizados para determinação de chumbo (Pb), arsênio (As) e cádmio (Cd)	64
<b>7</b>	<b>RESULTADOS OBTIDOS E DISCUSSÃO</b>	65
7.1	Controle de Qualidade	65

7.2	Ensaio complementares	66
7.2.1	Análise granulométrica	66
7.2.2	Umidade relativa	67
7.3	Estudo de homogeneidade	67
7.3.1	Homogeneidade para mercúrio total (Hg total)	67
7.3.2	Homogeneidade para metilmercúrio (MeHg)	69
7.3.3	Análise de tendência nas medições para estudo de homogeneidade para Hg total	71
7.3.4	Análise de tendência nas medições para estudo de homogeneidade para MeHg	72
7.4	Estudo da massa mínima	72
7.5	Estudo de Estabilidade	73
7.5.1	Estabilidade para mercúrio total (Hg total) nas temperaturas de 20 °C e 40 °C	73
7.5.1	Estimativa da incerteza para a estabilidade de Hg total	75
7.5.2	Estabilidade para mercúrio total (Hg total) na temperatura de 8 °C	76
7.5.3	Estabilidade para metilmercúrio (MeHg) nas temperaturas de 20 °C e 40 °C	77
7.5.3.1	Estimativa da incerteza para a estabilidade de MeHg	79
7.5.4	Estabilidade para metilmercúrio (MeHg) na temperatura de 8 °C	79
7.6	Determinação de mercúrio, metilmercúrio e chumbo nas amostras do material candidato a material de referência pela técnica de IDMS	80
7.6.1	Calibração da solução de traçador de mercúrio	80
7.6.2	Calibração da solução de traçador de chumbo	81
7.6.3	Determinação da concentração de mercúrio e chumbo pela técnica de IDMS	81
7.6.4	Determinação da concentração de metilmercúrio pela técnica de IDMS	83
7.7	Estimativa da incerteza associada ao valor certificado	84
7.8	Incerteza expandida para os analitos Hg total e MeHg	88
7.8.1	Incerteza expandida associada ao valor certificado para mercúrio (Hg)	88

7.8.2	Incerteza expandida associada ao valor certificado para metilmercúrio (MeHg)	88
7.9	Resultados dos valores obtidos de concentração e incerteza expandida associada para os analitos Hg e MeHg	89
7.10	Resultados dos valores obtidos de concentração e incerteza expandida associada para os analitos chumbo (Pb), Arsênio (As) e Cádmio (Cd)	89
7.10.1	Resultados dos valores obtidos de concentração e incerteza expandida associada para o analito chumbo (Pb)	89
7.10.2	Resultados dos valores obtidos de concentração e incerteza expandida associada para o analito arsênio (As)	90
7.10.3	Resultados dos valores obtidos de concentração e incerteza expandida associada para o analito cádmio (Cd)	90
7.11	Comparação dos resultados obtidos de concentração de Hg e MeHg por diferentes técnicas analíticas	90
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	92
	<b>APÊNDICE A – Resumo do relatório de validação do ensaio: Determinação de mercúrio total em amostra de peixe por meio da técnica FIA-CV-AAS</b>	97
	<b>APÊNDICE B – Modelo de planilha utilizada para cálculo do analito mercúrio para determinar a massa de amostra e massa de traçador necessárias para compor a mistura (amostra + traçador)</b>	102
	<b>APÊNDICE C – Gráfico de controle dos resultados obtidos, para Hg total, do material de referência Dorm-2, no período de 2010</b>	103
	<b>APÊNDICE D – Gráfico de controle dos resultados obtidos, para MeHg, do material de referência Dorm-2, no período de 2007 a 2010</b>	104
	<b>ANEXO A – Descrição dos testes de Grubs e de Dixon</b>	105
	<b>ANEXO B – Certificado de acreditação</b>	107
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	108

## LISTA DE TABELAS

	Página	
Tabela 1	Equações de análise da variância para regressão linear	23
Tabela 2	Composição isotópica do traçador de mercúrio IRMM 640	59
Tabela 3	Composição isotópica do padrão de mercúrio (IRMM 639) utilizado para calibração do traçador	59
Tabela 4	Composição isotópica do traçador de chumbo ( $^{207}\text{Pb}$ , ORNL)	60
Tabela 5	Composição isotópica do padrão de chumbo (NIST SEM 981) utilizado para calibração do traçador	60
Tabela 6	Resultados obtidos da determinação de mercúrio total e metilmercúrio, por meio da técnica FIA-CV-AAS, para outros materiais de referência	66
Tabela 7	Resultado obtido na análise granulométrica do material	67
Tabela 8	Resultados obtidos dos valores médios, desvio padrão e variância dos resultados das replicatas analisadas para Hg total	68
Tabela 9	Resultados obtidos da análise de variância (ANOVA) dos resultados de Hg total	68
Tabela 10	Teste de homogeneidade entre frascos, aplicado aos dados de MeHg	70
Tabela 11	Dados obtidos com medições de Hg total na estatística de regressão	71
Tabela 12	Dados obtidos com medições de MeHg na estatística de regressão	72
Tabela 13	Resultados obtidos para estudo de estabilidade de Hg total na temperatura de 20 °C	74
Tabela 14	Análise da tabela de variação para regressão linear de dados de estabilidade de Hg total no MRC, em temperatura de 20 °C	74
Tabela 15	Resultados obtidos para estudo de estabilidade de Hg total na temperatura de 40 °C	75
Tabela 16	Análise da tabela de variação para regressão linear de dados de estabilidade de Hg total no MRC, em temperatura de 40 °C	75

Tabela 17	Resultados obtidos para estudo de estabilidade de Hg total na temperatura de 8 °C	76
Tabela 18	Análise da tabela de variação para regressão linear de dados de estabilidade de Hg total no MRC, em temperatura de 8 °C	77
Tabela 19	Resultados obtidos para estudo de estabilidade de MeHg na temperatura de 20 °C	77
Tabela 20	Análise da tabela de variação para regressão linear de dados de estabilidade de MeHg no MRC, em temperatura de 20 °C	78
Tabela 21	Resultados obtidos para estudo de estabilidade de MeHg na temperatura de 40 °C	78
Tabela 22	Análise da tabela de variação para regressão linear de dados de estabilidade de MeHg no MRC, em temperatura de 40 °C	78
Tabela 23	Resultados obtidos para estudo de estabilidade de MeHg na temperatura de 8 °C	79
Tabela 24	Análise da tabela de variação para regressão linear de dados de estabilidade de MeHg no MRC, em temperatura de 8 °C	80
Tabela 25	Calibração da solução do traçador isotópico enriquecido em Hg <sup>202</sup>	81
Tabela 26	Calibração da solução do traçador isotópico enriquecido em <sup>207</sup> Pb	81
Tabela 27	Resultados da determinação da concentração de mercúrio e chumbo, nos materiais de referência analisados, obtidos pela técnica de DIEM com adição de dois traçadores ( <sup>202</sup> Hg e <sup>207</sup> Pb)	82
Tabela 28	Resultados da determinação da concentração de mercúrio e chumbo, nas replicatas da amostra, obtidos pela técnica de DIEM com adição de dois traçadores ( <sup>202</sup> Hg e <sup>207</sup> Pb)	82
Tabela 29	Resultados da determinação da concentração de metilmercúrio, nos materiais de referência analisados, obtidos pela técnica de DIEM com adição do traçador <sup>202</sup> Hg	83
Tabela 30	Resultados da determinação da concentração de metilmercúrio, nas replicatas da amostra, obtidos pela técnica de DIEM com adição do traçador <sup>202</sup> Hg	83
Tabela 31	Valores de cada fonte de incerteza, sua incerteza padrão associada e a incerteza relativa, para a certificação de Hg total	84
Tabela 32	Valores de cada fonte de incerteza, sua incerteza padrão associada e a incerteza relativa, para a certificação de MeHg	85
Tabela 33	Valores de cada fonte de incerteza, sua incerteza padrão associada e a incerteza relativa, para a certificação de Pb	86

Tabela 34	Estimativas das incertezas padrão combinadas, em $\mu\text{g g}^{-1}$ , para os analitos determinados	87
Tabela 35	Valores de concentração dos analitos certificados acompanhados de sua incerteza expandida	89
Tabela 36	Valor de concentração do analito chumbo (Pb) acompanhado de sua incerteza expandida	89
Tabela 37	Valor de concentração do analito arsênio (As) acompanhado de sua incerteza expandida	90

## LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SIGLAS

AAS	Espectrofotometria de Absorção Atômica, Atomic Absorption Spectrometry
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANOVA	Análise da Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
$b_0$	Estimativa para intersecção
$b_1$	Estimador para inclinação
BCR	(do francês: Gabinete Comunitário de Referência) – Bureau Communautaire de Références
CETEM	Centro de Tecnologia Mineral
CRPq	Centro do Reator de Pesquisas
EURACHEM	Enfoque para Química Analítica na Europa - Focus for Analytical Chemistry in Europe
F	Estatística da distribuição $F$
FAAS	Absorção Atômica com atomização em chama
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FIA-CV-AAS	Espectrofotometria de Absorção Atômica com injeção em fluxo e geração de vapor frio, Flow Injection Analysis-Cold Vapor-Atomic Absorption Spectrometry
FIG.	Figura
gl	Graus de liberdade (na ANOVA)
ICP OES	Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado, Inductively Coupled Plasma Optic Emission Spectrometry
ICP-MS	Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado, Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
IDMS	Diluição isotópica aplicada a espectrometria de massas, isotope dilution mass spectrometry
INAA	Análise por Ativação Neutrônica Instrumental, Instrumental Neutron Activation Analysis
INCQS	Instituto Nacional de Controle da Qualidade na Saúde
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
INT	Instituto Nacional de Tecnologia
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
IPT	Instituto de Pesquisas Tecnológicas
IRMM	Instituto de Medições e Materiais de Referência - Institute for Reference Materials and Measurements

ISO	Organização Internacional de Normalização
K	Temperatura kelvin
KGy	Quilogray, unidade de dose de radiação, em função da energia absorvida pelo produto irradiado
LCQ	Laboratório de Caracterização Química
LQ	Limite de quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MQ	Média quadrática (na ANOVA)
MQ <sub>dentro</sub>	Média quadrática dentro dos frascos (na ANOVA)
MQ <sub>entre</sub>	Média quadrática entre frascos (na ANOVA)
MR	Material de Referência
MRC	Material de Referência Certificado
NIST	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia dos Estados Unidos da América, National Institute for Standards & Technology
NRCC	Conselho Nacional de Pesquisa do Canadá, National Research Council Canadá
OMC	Organização mundial do Comércio
ORNL	Oak Ridge National Laboratory
s(b <sub>j</sub> )	Desvio padrão para o estimador para inclinação
s <sub>bb</sub>	Desvio padrão de homogeneidade (heterogeneidade) entre frascos
s <sup>2</sup> <sub>an</sub>	Variância analítica (para teste de “homogeneidade suficiente”)
s <sup>2</sup> <sub>bb</sub>	Variância de homogeneidade (heterogeneidade) entre frascos
S <sup>2</sup> <sub>sam</sub>	Estimativa da variância analítica entre frascos
SI	Sistema Internacional de Unidades
SPS	Sanitários e Fitossanitários
SQ	Soma quadrática (na ANOVA)
t	Valor crítico superior da distribuição <i>t</i> de Student
TAB.	Tabela
U	Incerteza expandida
UE	União Européia
VIM	Vocabulário Internacional de Metrologia
$U_{MRC_{Hg}}$	Incerteza expandida para o analito mercúrio no MRC
$U_{MRC_{MeHg}}$	Incerteza expandida para o analito metilmercúrio no MRC
$\mu_{bb} =$	Incerteza padrão devida à homogeneidade (heterogeneidade) entre frascos

$\mu_{\text{car}}$	Incerteza padrão devida à caracterização
$\mu_{\text{lts}}$	Incerteza padrão devida à estabilidade (instabilidade) a longo prazo
$\mu\text{m}$	Micrômetro
$\mu_{\text{MRC}_{\text{Hg}}}$	Incerteza combinada padrão para o analito mercúrio no MRC
$\mu_{\text{MRC}_{\text{MeHg}}}$	Incerteza combinada padrão para o analito metilmercúrio no MRC
$\mu_{\text{sts}}$	Incerteza padrão devida à estabilidade (instabilidade) a curto prazo
$\sigma_{\text{an}}$	Desvio padrão analítico (para teste de “homogeneidade suficiente”)
$\sigma_{\text{p}}$	Desvio padrão alvo (ou esperado) (para teste de “homogeneidade suficiente”)
$\sigma_{\text{all}}^2$	Variância permissível entre-amostras (para teste de “homogeneidade suficiente”)

## 1 – INTRODUÇÃO

O aumento da competitividade nas operações comerciais, seja no mercado interno ou externo, tem como consequência a adequação de todo sistema produtivo à rígidas normas de qualidade nacionais e internacionais. Nesse processo, aos laboratórios responsáveis pela emissão de laudos de análise exige-se o estabelecimento de um programa de qualidade que assegure, de forma inequívoca, a rastreabilidade de todas as operações envolvidas no processo de emissão de resultados. Rastreabilidade, segundo o Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM)<sup>1</sup>, é definida como “propriedade de um resultado de medição pela qual tal resultado pode ser relacionado a uma referência através de uma cadeia ininterrupta e documentada de calibrações, cada uma contribuindo para a incerteza de medição”, sendo que “referência” pode ser entendida como uma unidade de medida por meio de sua realização prática, ou um procedimento de medição que engloba uma unidade de medida ou ainda um padrão.

A legislação atual estabelece critérios para credenciamento, reconhecimento ou acreditação de laboratórios que realizem análises para controles oficiais ou programas nacionais gerenciados por ministérios ou órgãos governamentais, requerindo processos de medição que atendam a rigorosos requisitos de qualidade para que os resultados sejam confiáveis e comparáveis entre si<sup>2,3</sup>.

Nesse contexto, os materiais de referência certificados (MRCs) desempenham importante papel na obtenção de resultados de medições rastreáveis ao Sistema Internacional de Unidades (SI), por meio de uma cadeia contínua de comparações. Dessa forma, a demanda por novos materiais de referência certificados (MRC) aumenta a cada dia em todas as áreas do conhecimento.

Segundo Roper et al.<sup>4</sup>, os diferentes tipos de materiais de referência obedecem a hierarquia mostrada na FIG. 1, de acordo com suas posições metrológicas.

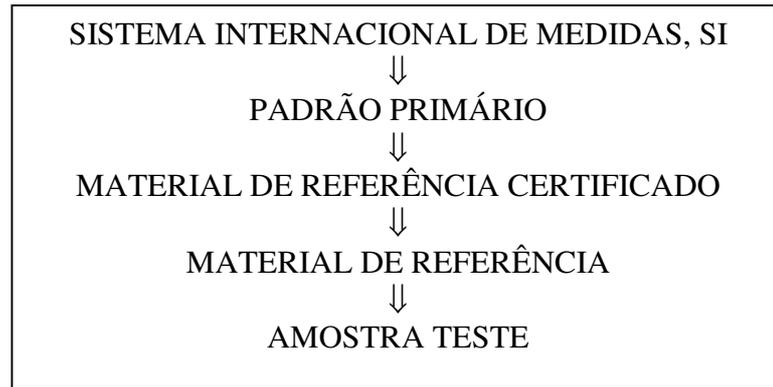


FIGURA 1. Hierarquia de materiais de referência.

Os padrões primários são aqueles produzidos com auxílio de um procedimento de medição primário sendo que representam, o alto nível de padrões químicos e, em princípio, fornecem um meio de estabelecer a rastreabilidade dos dados analíticos para as unidades de medida SI, como o quilo, o metro e o mol. Definições formais para padrões primários podem ser encontradas na literatura<sup>1,5</sup>.

Segundo o VIM<sup>1</sup> e ABNT ISO GUIA 30<sup>6</sup>, material de referência certificado (MRC) é definido como “um material de referência acompanhado de uma documentação emitida por um organismo com autoridade, a qual fornece um ou mais valores de propriedades especificadas com as incertezas e as rastreabilidades associadas, utilizando procedimentos válidos”. Ainda segundo o VIM<sup>1</sup>, a documentação mencionada é emitida sob a forma de um certificado. Incerteza de medição ou incerteza, segundo o VIM<sup>1</sup>, é definida como “um parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando, com base nas informações utilizadas”.

Material de referência (MR), conforme definição no VIM<sup>1</sup>, é aquele material, suficientemente homogêneo e estável em relação a propriedades específicas, preparado para se adequar a uma utilização pretendida numa medição ou num exame de propriedades qualitativas. A definição no VIM traz ainda uma importante nota que explica que o exame de uma propriedade qualitativa de um material fornece um valor a essa propriedade e uma incerteza associada, porém, essa incerteza não é uma incerteza de medição.

A diferença entre ambos é que, enquanto um material de referência (MR) 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.

Em termos de composição química, os materiais de referência podem ser classificados em dois tipos<sup>4</sup>: os materiais de referência de substância simples (incluindo os padrões primários) e os materiais de referência baseados em uma matriz. Os materiais de referência de substância simples são produtos químicos puros (elementos ou compostos), ou soluções de produtos químicos puros com valores de referência bem caracterizados para determinadas propriedades tais como: pureza, concentração, ponto de ebulição, ponto de fusão, viscosidade, absorvância, entre outras. Estes materiais são utilizados, principalmente, nas etapas de medição de um processo analítico (calibração de equipamentos, por exemplo) ou determinação de alguma propriedade específica. Os materiais de referência de matriz são usualmente materiais genuínos contendo o analito ou analitos de interesse na sua forma natural. Este tipo de padrão deve observar o maior grau possível de semelhança com a natureza da amostra a ser analisada, conter analitos com valores de referência bem caracterizados, e na medida do possível, similares aos existentes na amostra em estudo. O uso mais importante de materiais de referência de matriz consiste em testar e validar metodologias analíticas. Juntos, são parte integrante, e importante, no desenvolvimento de todo processo analítico, assegurando dessa forma a qualidade em todas as etapas que envolvem a caracterização química de uma amostra.

Importante observar que o uso correto de um MRC é de forma contínua e periódica permitindo, com isso, identificar possíveis desvios, erros ou falhas no sistema de gestão da qualidade associado a um determinado protocolo analítico. Nesse processo, os dados obtidos devem ser regularmente reavaliados (por métodos estatísticos ou simples gráficos de controle) auxiliando aos operadores na tomada de ações preventivas e/ou corretivas.

Uma vez atendidas as especificações descritas em seu certificado e manipulados em ambientes adequados, os MRC's podem ser utilizados em qualquer tipo de laboratório (universidades, serviços, indústrias, institutos de pesquisa, dentre outros). Entretanto, para aqueles laboratórios que desejam operar dentro de um sistema de gestão da qualidade, o seu uso contínuo torna-se uma importante, e imprescindível, ferramenta na implantação e manutenção desse sistema.

Dessa forma, sua utilização auxilia na capacitação técnica dos colaboradores e procedimentos envolvidos no processo analítico, uma vez que, colaboram não somente na otimização, mas também no contínuo aprimoramento das etapas essenciais do processo, identificando e mantendo o grau de incerteza expandida.

Nos últimos anos várias organizações internacionais desenvolveram materiais de referência certificados a fim de suprir as inúmeras demandas existentes<sup>7,8,9,10</sup>.

Existem sistemas de busca que podem ajudar na localização de materiais de referência. O COMAR<sup>11</sup> (International database for certified reference materials), por exemplo, é uma rede de organizações que dissemina informações sobre materiais de referência certificados disponíveis. Quando pesquisado nesse sistema, considerando como parâmetros de busca a forma pó, na composição química tendo mercúrio total e o Brasil como produtor, não encontramos nenhum fornecedor nacional, porém o total de materiais disponíveis é igual a 235.

A disponibilidade de materiais de referência, principalmente no Brasil, ainda é incipiente, face a demanda que excede em muito a variedade disponível desses materiais.

Além disso, a aquisição dos MRC's implica em investimento de alto custo e muita burocracia gerando assim, fatores inibidores para o uso contínuo desses materiais para controle das medições realizadas. Diante desse fato, a necessidade de contribuir para o desenvolvimento tecnológico do país aumentando a disponibilidade de materiais de referência em áreas diversas tornou-se meta de pesquisadores e instituições.

## 2 – OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho consiste no desenvolvimento e preparação, do primeiro material de referência nacional em matriz peixe, a ser certificado no teor de mercúrio (Hg) e metilmercúrio (MeHg), dentro dos conceitos e diretrizes das normas ISO Guia 34<sup>12</sup> e 35<sup>13</sup>, específicas para materiais de referência e também ABNT NBR ISO/IEC 17025<sup>14</sup>.

Este material de referência certificado (MRC) visa sanar uma deficiência no país quanto à disponibilidade desse tipo de material na área de alimentos colaborando com empresas exportadoras de pescado e órgãos governamentais.

Além dos analitos citados acima, chumbo (Pb), cádmio (Cd) e arsênio (As), foram também determinados, porém, seus teores não foram certificados, constituindo-se de elementos potencialmente tóxicos e seus teores máximos fixados em legislações<sup>15,16</sup>.

### **3 – RELEVÂNCIA**

O Brasil é um país rico em recursos naturais com grande extensão de terras cultiváveis e possui uma linha contínua de costa com mais de oito mil quilômetros de extensão, nos quais existem 174 territórios de pesca e aquicultura<sup>17</sup>. Assim, a produção de alimentos é um importante item, quer no atendimento a demanda interna, quer na demanda externa, onde agricultura, pecuária e pesca constituem importantes eixos da nossa balança comercial.

Neste cenário destaca-se a produção de pescados no Brasil, pois a ampla costa litorânea, incluindo regiões de climas tropicais e subtropicais, estimula a pesca comercial e artesanal e representa um importante papel na economia, principalmente nas regiões norte e nordeste que respondem por aproximadamente 55% da produção estimada de pescados<sup>18</sup>. Sendo assim, a gestão do uso dos recursos pesqueiros sempre foi uma preocupação do governo federal e por esse motivo, foi criada em 2003, a Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca da Presidência da República, elevada posteriormente a Ministério da Pesca e Aquicultura, que tem como principal função promover a execução e a avaliação de medidas, programas e projetos de apoio ao desenvolvimento da pesca artesanal e industrial, bem como de ações voltadas à implantação de infra-estrutura de apoio à produção e comercialização do pescado. Segundo dados do próprio ministério<sup>18</sup>, entre 2007 e 2009, o país apresentou um crescimento na produção de pescados, em relação a produção pecuária, da ordem de 15,7%. Somente no ano de 2009 houve um aumento de 4% na produção brasileira de pescado. Outro dado importante diz respeito ao aumento do consumo de pescado por pessoa no país, que segundo o Ministério da Pesca e Aquicultura houve um crescimento de 6,46 kg para 9,03 kg por habitante/ano entre 2003 e 2009<sup>19</sup>. Apesar de não figurar dentre os maiores valores dos produtos de exportação, apenas 0,04% das exportações em valor, ainda assim apresenta um volume crescente de produção já que no período de janeiro a novembro de 2010 foram exportados cerca de US\$ 70 milhões (US\$ F.O.B.) de peixes congelados, frescos ou refrigerados<sup>20</sup>. De acordo com os dados do relatório da Estatística de Pesca Brasileira<sup>18</sup>, os principais importadores de pescado do Brasil são os Estados Unidos da América (EUA), França e Espanha, que representam mais de 50% das exportações de pescados.

A crescente exigência dos consumidores por alimentos saudáveis e de qualidade, aliada à preocupação com a sanidade animal e vegetal, tornou indispensável o tratamento adequado das questões sanitárias e fitossanitárias nas negociações agropecuárias internacionais.

Os Acordos Sanitários e Fitossanitários (SPS), da Organização Mundial do Comércio (OMC), estabelecem ações para a proteção de plantas e animais ou para a inspeção de produtos derivados.

Nas exportações de produtos de origem animal, como o pescado, além das negociações tradicionalmente presentes numa operação de comércio internacional, como preço, impostos, prazo de entrega, dentre outros, também estão presentes os requisitos sanitários (considerando normas, guias e recomendações internacionais) impostos pelo país importador.

Outra medida prevista no princípio da transparência do Acordo SPS da OMC, exige que todos os regulamentos sanitários e fitossanitários, que tenham sido adotados por algum país, devam ser notificados pelos seus órgãos controladores (chamados de Pontos Focais) aos demais Membros, por intermédio da Secretaria da OMC, informando quais serão os produtos afetados pelo regulamento, qual o objetivo e o motivo do regulamento.

No Brasil existem dois Pontos Focais para o Acordo SPS da OMC, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e a Secretaria de Relações Internacionais (SRI) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). No MAPA, as questões de comércio interestadual ou internacional de produtos da pesca e da aquicultura são tratadas pelo Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal – DIPOA, por meio de sua Divisão de Inspeção de Pescado e Derivados – DIPES, que tem como uma de suas atribuições a análise, para efeito de aprovação preliminar, do programa de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) das empresas e análise dos pedidos para exportação, procedendo à habilitação em duas listas distintas, a saber: uma definida como lista geral, à exceção dos países membros da União Européia (UE); outra específica, atualmente definida como Lista da União Européia, que inclui todos os países<sup>21</sup>. No caso específico da União Européia, existe uma peculiaridade a ser registrada, e que não acontece com os demais países: a efetivação das exportações somente acontecerá após a homologação concedida pelas autoridades da União Européia.

Todos esses procedimentos são tão importantes, para evitar novo embargo, como o ocorrido em 2006 pela UE<sup>(22)</sup>, onde alegou-se risco de contaminação em nosso pescado. Desde aquela data a UE exige adaptações de equipamentos e controle de qualidade no setor para atender as exigências do mercado daquele continente. O risco de restrições à venda de pescado brasileiro atingiu as indústrias e cooperativas de pescadores artesanais e afetou a exportação de toda a produção pesqueira no Brasil.

Para cumprir as exigências do mercado europeu, o governo brasileiro está, enfim, ampliando o número de laboratórios acreditados, para fazer as análises de controle de qualidade nas amostras em cada lote de pescado para exportação.

Apesar disso, a área de alimentos representa uma das mais carentes em disponibilidade de materiais de referência, quer pela importância desses produtos na balança comercial do país ou no desenvolvimento de novas metodologias de análise. A certificação de produtos alimentícios, destinados tanto para exportação como para o consumo interno, requer metodologias de análise que ofereçam resultados precisos e exatos a fim de assegurar a qualidade do produto, assim como, garantir que todas as barreiras sanitárias e de comércio exterior, incluindo aquelas que atendam aos limites dos metais potencialmente tóxicos, estejam satisfeitas.

## 4 – CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS

### 4.1 Histórico dos Materiais de Referência segundo o NIST

O primeiro fato diretamente ligado à história dos materiais de referência nos leva ao ano de 1833<sup>23</sup>, no local chamado de Heightstown, New Jersey – EUA. O ex-presidente americano John Quincy Adams acompanhado de Cornelius Vanderbilt estavam dentro de um trem que sofreu um descarrilamento, com vítimas, durante seu percurso. Esse tipo de acidente era comum na época e com o objetivo de prevenir a perda de outras vidas iniciou-se uma ação para convencer a então criada “Agência”, depois denominada Agência de Padrões, para a ousadia de certificar materiais de referência.

Em 1905, a American Foundrymen’s Association em parceria com a Agência de Padrões, depois denominada National Bureau of Standards (NBS), iniciou um trabalho para tentar resolver o problema de descarrilamento de vagões devido a fraturas nas rodas de ferro fundido. Nessa época, pesquisa realizada pela American Foundrymen’s Association 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, suficientemente, exatas para garantir a composição de seus produtos. O problema nos laboratórios era ter uma fonte de materiais analisados com exatidão, tendo composições dentro de especificações conhecidas e faixas aceitáveis. Estes materiais “padronizados” seriam usados pelos laboratórios das fundições para manter suas análises sob controle.

Quando o primeiro projeto foi terminado em 1906, quatro materiais foram colocados à venda com seus certificados de análises para servir como referência. Eles consistiam de frascos com aparas de ferro fundido. Em 1910, foi produzido novo lote das amostras com denominação de “Amostras Padrão”.

O sucesso dos materiais de referência de ferro fundido contribuiu para a expansão do conceito de materiais de referências e assim se introduziram novos materiais. Com a atividade de certificação de muitas ligas metálicas, minérios de ferro e escória de cobre iniciou a revolução dos materiais de referência. Em 1911, o catálogo de materiais de referência já continha 25 itens.

No período que compreendeu as duas guerras mundiais, a atividade de desenvolvimento de materiais de referência cresceu lentamente. Quando Dwight Eisenhower tornou-se presidente dos EUA em 1953, um de seus programas era unir uma parte da Nação com modernas auto-estradas. A Agência de Estradas Públicas americana não tinha laboratórios, então iniciou um programa de financiamento junto ao NBS que culminou na organização de laboratórios de pesquisa de concreto e cimento. Dessa forma, o catálogo de materiais de referência expandiu-se com oferecimento de materiais com composição de cimento, tamanho de partícula e de reologia (estudo das águas correntes).

Durante os anos 50 e 60 houve uma aceleração de esforços para certificar materiais de referência e assim até 1969 já existiam 582 tipos de materiais disponíveis no catálogo do NBS.

Os anos 70 foi um dos períodos de maior desenvolvimento em termos de quantidade e variedade de materiais de referência. Nos Estados Unidos, mais de 600 novos materiais de referência foram certificados nesse período e quase 250 foram descontinuados. Em 1979, existiam 1060 tipos de materiais no catálogo, principalmente de matrizes ambientais naturais e biológicas, certificadas para constituintes inorgânicos, como por exemplo: soro humano, tecido de plantas, sedimentos de rio, material particulado urbano. Em 1973, um departamento do Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM), na Bélgica, fundado em 1957, foi estabelecido como mandatário para organizar a certificação e a distribuição de materiais de referência. Este departamento foi chamado Bureau Communautaire de Références (BCR).

Durante os anos 80, muitos avanços foram obtidos na introdução de materiais de referência ambientais inorgânicos com adição de certificação de parâmetros orgânicos de interesse ambiental, em matrizes como soro humano, óleo e sedimentos. Nessa mesma década, foram desenvolvidos materiais de referência de alimentos, como por exemplo: farinha de trigo, farinha de arroz, fígado bovino, tecido de ostra e folhas de espinafre. Nos anos 90, houve grande progresso com a certificação de vitaminas em misturas diet, fórmulas infantis e vários outros materiais alimentícios.

É impressionante a história e o trabalho desenvolvido na produção de materiais de referência certificados nesses últimos anos. Somente o NBS, atual National Institute of Standards and Technology – NIST, continha até 2002, cerca de 1400 materiais de referência em seu catálogo. Atualmente, o catálogo<sup>24</sup> contém cerca de 1300 materiais de referência certificados, uma vez que, alguns materiais tiveram sua produção descontinuada. O catálogo<sup>25</sup> do IRMM – BCR contém cerca de 620 materiais de referência certificados.

#### 4.2 Produção e distribuição de materiais de referência no Brasil

Um pequeno número de instituições produz e comercializa materiais de referência certificados no país. O Instituto de Pesquisas Tecnológicas – IPT<sup>26</sup>, localizado nas dependências da Universidade de São Paulo (USP), desde 1975 desenvolveu mais de 130 tipos de materiais de referência certificados, sendo que produz e comercializa padrões de minerais, metais, materiais inorgânicos diversos, padrões físicos e de petróleo, constituídos de padrões de aço, ligas metálicas, minérios, viscosidade, teor de enxofre, ponto de fulgor, ponto de fluidez, densidade, entre outros. O Centro de Tecnologia Mineral – CETEM<sup>27</sup> produz padrões de bauxita, minério de sulfetos de cobre e concentrado de sulfetos de cobre. O Instituto Nacional de Controle da Qualidade na Saúde (INCQS)<sup>28</sup>, unidade da Fundação Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro, iniciou em 1982 um programa para estabelecimento de materiais de referência. O INCQS possui microrganismos de referência e substâncias químicas de referência certificadas que são substâncias químicas utilizadas como parâmetro para teste de outras substâncias. O Instituto Nacional de Metrologia, normalização e qualidade industrial<sup>29</sup> – INMETRO produz e comercializa, conforme informado em sua página na Internet, padrões de bioetanol, pH, condutividade eletrolítica, etanol em água, cachaça e ácido clorídrico.

Existem importantes iniciativas no país para a produção de materiais de referência. Em 1998, o projeto multi-institucional “Implementação da Metrologia em Química no Brasil: Organização de redes de laboratórios e estruturação das atividades de produção de Materiais de Referência”, coordenado pelo IPT, com apoio do INMETRO, foi aprovado pelo Ministério de Ciência e Tecnologia, dentro do Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Tecnologia Industrial Básica (PADCT/TIB). As instituições Centro de Tecnologia Mineral – CETEM, Instituto Nacional de Tecnologia – INT, Instituto de Pesquisas Tecnológicas – IPT e o Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN, no qual foi desenvolvido este trabalho, participaram do projeto desde seu início. Ainda no Ipen, outras importantes iniciativas foram a preparação de um conjunto de materiais de referência isotópicos de urânio concluída em 2006<sup>30</sup> e a preparação do material de referência certificado na matriz de mexilhão “perna-perna” realizado no Centro do Reator de Pesquisas – CRPq<sup>31</sup>. Iniciativas também estão presentes através de pesquisas na Universidade Federal da Bahia<sup>32,33</sup> e a existência de linhas de fomento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP que seleciona projetos direcionados a novas linhas de pesquisa, como por exemplo:

“Desenvolvimento de material de referência silício metálico grau químico” e “Avaliação de parâmetros e produção de materiais de referência de sangue, tecido muscular e vísceras de peixe para controle ecotoxicológico”<sup>34</sup>.

### 4.3 Produção de um MRC

Com o intuito de fornecer uma sistemática para os produtores dos materiais de referência, detalhando requisitos, que abrangem desde condições ambientais para preparação até rotulagem dos frascos, algumas normas foram publicadas pela International Organization for Standardization (ISO) e traduzidas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT)<sup>6,35,36,37,12,13</sup>. Dentre estas normas, a ABNT ISO GUIA 34<sup>12</sup> – “Requisitos gerais para competência de produtores de material de referência” fornece todas as diretrizes e requisitos que devem ser cumpridos pelos produtores, desde a organização de toda a documentação necessária até o planejamento da produção do material de referência, sendo uma das normas mais importantes no processo de produção de um material de referência. Os produtores, segundo um dos itens dessa norma, necessitam ter um adequado sistema da qualidade, normalmente baseado na norma ABNT NBR ISO/IEC 17025<sup>14</sup>, para garantir a confiabilidade nos materiais preparados.

Para a produção de materiais de referência é vital que exista um adequado sistema da qualidade implantado para não apenas assegurar a confiabilidade desses materiais, mas também fornecer ao cliente e usuário a evidência clara da confiabilidade. A produção de materiais de referência é uma importante ramificação dos processos de medição e de produção os quais envolvem, em muitos casos, pesquisa e desenvolvimento, além de um minucioso estudo sobre custo de todas as atividades envolvidas. Dessa forma, a produção de materiais de referência não pode ser entendida com uma atividade trivial e sim merecedora de grande atenção por todos aqueles que pretendem produzir um material certificado.

Outra norma igualmente importante é a ISO Guia 35<sup>13</sup> - Certification of reference materials – General and statistical principles que foi traduzida por um grupo designado pela ABNT e está em processo de finalização. Esta norma fornece as diretrizes dos testes estatísticos a serem executados com o candidato a material de referência, instruindo sobre as formas possíveis de caracterização do material de referência.

### **4.3.1 Seleção do material e processamento**

Uma vez que o material de referência (MR) a ser produzido já foi identificado e confirmada a necessidade de sua demanda, a fonte principal do material bruto a ser utilizado na produção é dependente da quantidade final do material a ser produzida. Fornecer e processar grandes quantidades de material requer equipamentos especializados, conhecimento e experiência e isto não está normalmente disponibilizado no escopo de um típico laboratório químico de ensaio.

Os materiais, candidatos a materiais de referência, devem ser processados de maneiras diversas para se tornarem adequados para uso como MRC. Cada etapa da preparação do material de referência necessita ser cuidadosamente planejada e documentada, desde a seleção do material e preparação do laboratório para início das atividades até o empacotamento final das amostras do material pronto para envio aos laboratórios participantes do estudo interlaboratorial, caso for utilizada uma rede de laboratórios com o objetivo de certificação. Portanto, o local onde serão realizadas as etapas deve ter, no mínimo, uma organização implantada baseada em princípios de qualidade total.

O processamento pode envolver secagem, trituração, moagem, peneiração, mistura, combinação de materiais, e várias outras etapas. Uma vez processado, o material necessita ser muito bem misturado e subdividido para embalagens individuais. Considerações cuidadosas devem ser pensadas sobre o tipo de frasco a ser usado para conter o MRC a fim de garantir a integridade do material e de seus valores certificados por longo período de tempo.

## **4.4 Certificação do material candidato a material de referência certificado**

As principais etapas da certificação do material compreendem os estudos de homogeneidade e estabilidade e a descrição detalhada da obtenção dos valores de propriedade do material denominada como caracterização.

### **4.4.1 Estudo de homogeneidade**

O termo “homogeneidade”, segundo a norma ISO Guia 30<sup>6</sup>, é definido como a “condição de uniformidade de estrutura ou composição com respeito a uma ou mais propriedades especificadas. Um material de referência é dito 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”.

Na preparação dos materiais de referência, espera-se que os mesmos tenham alto grau de homogeneidade. Porém, apesar de todo esforço realizado, os materiais podem apresentar alguma heterogeneidade. Dessa forma, o produtor do material tem que assegurar e provar a homogeneidade utilizando, para esse objetivo, procedimentos adequados em detectar quaisquer impurezas, interferências ou irregularidades, que podem ser devidas a problemas não detectados durante a preparação.

Os aspectos de garantia de qualidade são tão importantes quanto a determinação da variação entre frascos restantes do lote, que é um componente de incerteza a ser incluído na estimativa da incerteza do valor da propriedade do MRC. Ao se lidar com materiais de referência no estado sólido, recomenda-se prever um estudo de homogeneidade dentro do frasco para determinar a tomada de amostra mínima. O número adicional de amostras requeridas depende, principalmente, do estudo de homogeneidade entre frascos. O número ideal de amostras para um estudo de homogeneidade pode ser determinado através de técnicas de planejamento apoiadas estatisticamente. Normalmente, tais métodos levam em consideração a incapacidade de se detectar qualquer heterogeneidade, por exemplo, devida à incerteza das medições. Além do mais, o número de frascos depende do tamanho do lote, de modo que o número de amostras extraídas do lote pode ser considerado como representativo do lote todo. Recomenda-se contrabalançar este requisito com a incerteza das medições, que é (em condições de repetitividade) uma função do desvio padrão de repetitividade da medição e do número de replicatas. As técnicas estatísticas acima mencionadas podem ajudar a contrabalançar o número de frascos e o número de replicatas de modo que a melhor abordagem seja escolhida. O número mínimo, segundo descrito na norma ISO Guia 35<sup>13</sup>, de frascos selecionados ao acaso se situa entre 10 e 30, porém, geralmente, recomenda-se não ser menor que 10. Existem vários métodos para selecionar o subconjunto do lote, por exemplo, amostragem aleatória, estratificada ou não, ou amostragem sistemática. Os planos de amostragem aleatória ou amostragem aleatória estratificada são, na maioria das vezes, empregados na prática e fornecem, normalmente, um subconjunto que pode ser considerado como representativo para todo o lote. Se houver certeza de que não será detectada heterogeneidade no lote, planos de amostragem sistemática também poderão ser utilizados. O planejamento de amostragem deve levar em consideração os pontos fracos potenciais no método de preparação das amostras, de forma a permitir um exame crítico do lote

preparado. A estratificação é recomendada em muitas situações, uma vez que isto garante que os frascos escolhidos para o estudo de homogeneidade estejam igualmente distribuídos em todo o lote. Os planejamentos sistemáticos podem ser empregados quando não há, praticamente, nenhum risco de se omitirem efeitos ou tendências sistemáticas no lote.

Um valor de propriedade medido em uma porção do lote é comparável a outra parte do lote dentro dos limites de incerteza aceitáveis. Para materiais sólidos (pós, grânulos, etc.), é usualmente necessário estabelecer a homogeneidade dentro e entre as unidades do lote selecionadas. Em geral, é importante utilizar um método que tenha uma boa precisão (repetitividade). Produzir resultados altamente exatos não é essencial, desde que o objetivo do exercício é avaliar a diferença (se existir alguma) nos valores de propriedade entre as unidades. Na prática, o material é frequentemente considerado como sendo homogêneo se a diferença entre uma porção do material e outra não pode ser detectada experimentalmente, isto é, a variação dentro da unidade e a variação unidade a unidade estão dentro da variância do método.

Se um material é produzido em muitos lotes, será necessário avaliar a equivalência dos lotes ou assegurar os valores de propriedade para cada lote separadamente. Avaliação da homogeneidade deve ser normalmente realizada após o material ter sido embalado na sua forma final a menos que o estudo de estabilidade indique que o armazenamento deva ser mantido em grandes quantidades, sem ser embalado. Em alguns casos, checar a homogeneidade intermediária pode ser necessário, por exemplo, antes de inserir líquidos em ampolas.

Há um limite experimental para a detecção de heterogeneidade do lote ( $u_{bb}$ ). Recomenda-se ter cuidado em não se subestimar este componente de incerteza devido às limitações oriundas, por exemplo, do método de medição. Em particular, quando apenas métodos com pouca repetitividade encontram-se disponíveis, tal risco de subestimação existe. Além do mais, sempre que possível, as sub-amostras utilizadas para a medição devem ser suficientemente grandes, de modo que este tipo de sub-amostragem não contribua significativamente, para a incerteza devida à repetitividade da medição.

Convém que as medições sejam feitas de tal maneira que quaisquer tendências que poderiam estar presentes nas amostras não interfiram em nenhuma tendência que poderia haver nas próprias medições. Em um planejamento de medição, isto pode ser conseguido, por exemplo, aleatorizando-se a ordem dos frascos, em combinação com a alteração da ordem em que as amostras são medidas. Para se detectar uma tendência devido a um desvio nas medições deve-se fazer uma análise de tendência nos resultados

obtidos. Na norma ISO Guia 35 é apresentada uma metodologia para análise de tendência, que pode ser utilizada tanto para estudo de estabilidade como para o estudo de homogeneidade. Se a tendência for significativa, então, normalmente, o lote produzido será inadequado para certificação. Uma tendência nos resultados de medição é algo a ser corrigido, independentemente dela ser estatisticamente significativa ou não. Um método para análise de tendência e, se necessário, para o desenvolvimento de uma correção para um desvio de instrumento, consiste na inclusão de uma amostra de controle de qualidade que possa ser inserida, diretamente no instrumento. Quando se observa uma tendência no lote, uma reformulação do procedimento de subdivisão pode ser necessária para eliminar tal tendência.

A quantidade mínima de amostra é determinada realizando-se um estudo de homogeneidade dentro do frasco para diferentes porções de ensaio. Como o desvio padrão de homogeneidade dentro do frasco depende do número de partículas que possuem uma certa propriedade, é possível determinar o número mínimo de partículas (ou a porção mínima de ensaio). Este mínimo constitui a menor quantidade de amostra para a qual o desvio padrão da porção de ensaio é igual ao desvio padrão de repetitividade do método de medição.

A quantidade mínima de amostra pode ser determinada experimentalmente ou através de extrapolação. A extrapolação dos desvios padrão dentro do frasco obtida a partir de diferentes tamanhos de sub-amostra pode ser empregada para se encontrar o menor tamanho de sub-amostra que não afete a repetitividade da medição para aquele parâmetro particular. Devido ao fato de que o desvio padrão de homogeneidade dentro do frasco constitui, geralmente, uma super-estimativa, a quantidade mínima de amostra também será normalmente super estimada.

Os resultados para os estudo da homogeneidade do material normalmente são avaliados pela análise da variância (ANOVA)<sup>13,38</sup>. Porém, este tipo de avaliação pode conduzir a conclusões errôneas em duas situações. Se o método analítico usado for pouco preciso, possíveis heterogeneidades não são detectadas e o teste indicará que o material é homogêneo. Por outro lado, se o método analítico é bastante preciso, o teste indicará que o material é heterogêneo, pois qualquer pequena diferença entre a composição dos frascos produzirá um resultado significativo de heterogeneidade. Baseado nos conceitos estatísticos, também existe a observação que as populações dos dados a serem tratados por ANOVA devem ter distribuição normal e variâncias iguais, o que limita muito a utilização dessa ferramenta estatística.

Com base nisso, um teste mais adequado para avaliar a homogeneidade de MRs foi proposto por Fearn & Thompson (2001)<sup>39</sup>, chamado de “homogeneidade suficiente”.

Nesse teste, diferentemente do realizado por ANOVA, é imposto um limite ao desvio padrão analítico, chamado de  $\sigma_{an}$  em relação ao “desvio padrão alvo (ou esperado)”, chamado de  $\sigma_p$ . Esse limite estabelece que a razão de  $\sigma_{an}$  por  $\sigma_p$  deve ser menor que 0,5, ou seja, a razão  $\sigma_{an}/\sigma_p < 0,5$ . Outro ponto diferente, nesse método, é o cálculo do valor crítico para comparação, sendo este calculado a partir da obtenção dos valores da variância permissível entre-amostras ( $\sigma_{all}^2$ ), da variância analítica ( $s_{an}^2$ ) e fatores ( $F_1$  e  $F_2$ ) extraídos de uma tabela de fatores usados para testar “homogeneidade suficiente”<sup>39</sup>.

Devido a melhor performance do teste de homogeneidade suficiente, em relação ao tradicional, ele foi incorporado ao “The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories” (Thompson et al. 2006)<sup>40</sup> e já citado em literatura nacional<sup>41</sup>.

A estimativa da incerteza da homogeneidade, a partir dos cálculos com ANOVA, é função dos valores da média quadrática (MQ) entre os frascos ( $MQ_{entre}$ ) e dentro dos frascos ( $MQ_{dentro}$ ). Quando a abordagem for a análise da variância de um fator, então, a variância entre frascos,  $S_{bb}$ , poderá ser calculada através de:

$$S_{bb}^2 = S_A^2 = \frac{MQ_{entre} - MQ_{dentro}}{n_0} \quad (1)$$

Onde:  $n_0$  = número de medições em cada frasco

E a incerteza ( $u_{bb}$ ) neste caso, é equivalente ao desvio padrão. Assim:

$$u_{bb} = S_{bb} = \text{desvio padrão entre frascos}$$

Nem sempre é viável realizar um estudo de homogeneidade com um método de medição que seja suficientemente repetitivo. Em tais casos, pode ser necessária uma abordagem alternativa que procure estimar o efeito máximo. Várias abordagens para se obter uma estimativa de incerteza que explique a repetitividade insuficiente do método de medição tem sido propostas. A influência do desvio padrão de repetitividade em  $S_{bb}$  pode ser explicada utilizando-se:

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

Onde:  $MQ_{dentro}$  é igual à variância de repetitividade das medições entre frascos,  $n$  é o número total de replicatas e  $V_{MQ_{dentro}}$  é o número de graus de liberdade para  $MQ_{dentro}$ .

A estimativa da incerteza da homogeneidade pode ser baseada também pela perspectiva do Guia para a Expressão da Incerteza de Medição<sup>42</sup> ou do guia EURACHEM<sup>43</sup> quando os valores forem obtidos por método alternativo não utilizando ANOVA. A variação das médias dos frascos ( $u_{c(bb)}$ ) é uma incerteza combinada consistindo da heterogeneidade entre-frascos ( $s_{bb}$ ) e a variação (desvio padrão) da medição ( $s_{meas}$ ). A relação entre  $u_{c(bb)}$ ,  $s_{bb}$  e  $s_{meas}$  pode ser expressa como<sup>44</sup>:

$$\mu_{c(bb)}^2 = s_{bb}^2 + s_{meas}^2 \quad (3)$$

o que implica em:

$$s_{bb}^2 = \mu_{c(bb)}^2 - s_{meas}^2 \quad (4)$$

Na prática,  $s_{meas}$  é obtida analisando-se um frasco várias vezes e  $u_{c(bb)}$  é obtida analisando-se várias unidades de frasco, obtendo um resultado de cada. Para a estimativa da variabilidade entre frascos, por esta abordagem, é vital que os resultados sejam obtidos pela mesma técnica analítica e usando a mesma quantidade de amostra. Vale ressaltar que aumentando-se o número de replicatas por frasco um melhor valor para  $s_{meas}$  pode ser obtido, mesmo para métodos pouco precisos.

#### 4.4.2 Estudo de estabilidade

Estabilidade, segundo ISO Guia 30<sup>6</sup>, é definida como “a capacidade do material de referência de manter o valor de uma determinada propriedade dentro de limites especificados por um período de tempo preestabelecido, quando estocado nas condições especificadas”. O teste de estabilidade, assim como o teste de homogeneidade é crucial no processo de certificação de materiais de referência. Normalmente, o tempo de vida de um material de referência certificado é de vários anos, onde os valores de propriedade devem ser constantes durante esse tempo de vida. Um requisito adicional é que durante o transporte, sob condições específicas, a estabilidade do material deve ser garantida pelo produtor. Estes aspectos devem ser considerados cuidadosamente no planejamento da etapa de certificação e a estabilidade do material deve ser demonstrada.

Há dois tipos de estabilidade/instabilidade a serem considerados na certificação de materiais de referência: a estabilidade a longo prazo do material (por exemplo, o tempo

de prateleira) e a estabilidade a curto prazo (por exemplo, estabilidade do material sob “condições de transporte”).

A estabilidade a longo prazo de um material de referência está associada ao comportamento do MR nas prateleiras do produtor. A estabilidade a curto prazo é associada a quaisquer efeitos extras devidos ao transporte das amostras.

Com frequência, é igualmente importante saber o que poderia acontecer à amostra se as condições apropriadas de transporte não forem mantidas. Em muitos casos, uma simples verificação do MRC antes da primeira utilização pode ser suficiente para confirmar a validade do certificado, enquanto que em outros casos é evidente que o MRC tenha se deteriorado. Este conhecimento permite ao produtor dar uma melhor assistência e, do ponto de vista do usuário, um produto melhor. Portanto, os estudos de estabilidade são realizados não apenas para avaliar a incerteza de medição associada à estabilidade do material, mas também para poder especificar as condições apropriadas de armazenamento e transporte.

Há dois planejamentos experimentais básicos para os estudos de estabilidade: o estudo clássico de estabilidade e o estudo isócrono de estabilidade.

No estudo clássico de estabilidade, amostras individuais preparadas ao mesmo tempo (por exemplo, como um lote), sob condições idênticas, são avaliadas na medida em que o tempo transcorre. Neste caso, o trabalho é realizado sob condições de reprodutibilidade (dentro do laboratório), o que leva a uma incerteza relativamente elevada, pois a instabilidade do sistema de medição também está incluído.

O estudo isócrono de estabilidade foi introduzido para permitir que todas as medições do estudo ocorram sob condições de repetitividade, isto é, em uma operação com uma calibração. A palavra “isócrono” ressalta o fato de que todas as medições estão ocorrendo ao mesmo tempo, e não distribuídas durante o período de tempo do estudo de estabilidade, como é o caso na abordagem clássica.

A abordagem isócrona reduz a dispersão dos pontos no tempo, aprimorando, assim, a “resolução” do estudo de estabilidade. Como consequência disso, o estudo de estabilidade isócrono, usualmente, leva a uma incerteza menor do que o estudo clássico, dependendo da diferença entre a repetitividade e a reprodutibilidade (dentro do laboratório) das medições. Um pré-requisito para este planejamento consiste em que se possa definir condições nas quais a degradação não ocorra ou, pelo menos, ocorra a uma velocidade diferente das condições selecionadas para o armazenamento. O planejamento isócrono é

especificamente projetado para certificações de lote, uma vez que ele não pode ser utilizado no caso em que um único artefato é certificado.

Ambos os planejamentos experimentais são adequados para estudos de estabilidade a longo prazo e a curto prazo. No caso do estudo de estabilidade a curto prazo, o comportamento do material e seus valores de propriedade é estudado, no mínimo, nas condições recomendadas (especificadas) para a embalagem e transporte. Quanto mais restritivas forem as condições para o transporte, menor será a escala em que se poderá manter o estudo de estabilidade a curto prazo. Recomenda-se aplicar condições para o transporte segundo as quais a instabilidade não seja maior do que no estudo de estabilidade a longo prazo, de modo que nenhuma contribuição da incerteza para a estabilidade/instabilidade a curto prazo precise ser incluída na certificação. Para vários tipos de materiais de referência (por exemplo, materiais de referência clínicos, biológicos e ambientais), nem sempre é evidente que se possa manter condições de transporte que permitam ignorar o efeito do mesmo sobre o material. Quando não se dispõe de nenhuma experiência anterior concernente a uma dada combinação matriz/propriedade, um estudo de estabilidade a curto prazo poderia ser realizado a diferentes temperaturas, a fim de obter informações sobre as condições apropriadas de armazenamento e a necessidade de tomar precauções durante o transporte.

Conforme a literatura, estudos de estabilidade envolvem amostras armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $+4^{\circ}\text{C}$ , a temperatura ambiente (aproximadamente a  $+20^{\circ}\text{C}$ ) e a  $+40^{\circ}\text{C}$ , e então analisadas após períodos de 0, 1, 3, 6, e 12 meses<sup>4</sup>. Ocasionalmente, materiais mais sensíveis, como, por exemplo, amostras microbiológicas, podem ser suficientemente estáveis e ser usadas como MRC se as mesmas forem mantidas em armazenamento a temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$  ou abaixo deste valor.

A natureza do recipiente usado para armazenar o MR pode ter um grande significado na estabilidade do material. Se não for escolhido corretamente, o material do recipiente pode interagir com o MR e afetar desfavoravelmente a estabilidade a longo prazo. A estabilidade a longo prazo de um MRC será também necessária ser monitorada por toda sua vida útil, isto é, significa o tempo de prateleira.

O primeiro passo na avaliação dos dados de um estudo de estabilidade consiste em verificar se qualquer tendência nos dados pode ser observada. No caso de pequenos problemas de instabilidade em que o mecanismo cinético subjacente é desconhecido, uma aproximação linear constitui um modelo adequado. Nos casos em que um mecanismo bem

definido é a razão para a instabilidade, tal modelo deve ser preferido ao modelo linear (empírico).

Dado um conjunto de  $n$  observações aos pares de  $Y$  versus  $X$ , para cada  $Y_i$  a seguinte expressão pode ser desenvolvida:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_i + \varepsilon_i \quad (5)$$

No caso de estudos de estabilidade,  $X$  indica o tempo, e  $Y$ , o valor da característica do candidato a MRC. Para um material de referência estável, espera-se que  $\beta_1$  seja zero. Com frequência, mais de um valor de  $Y_i$  estará disponível para cada  $X_i$ , devido à repetição da medição, ao uso de mais de um frasco por ponto no tempo. É recomendado que tais aspectos sejam incluídos no modelo do estudo particular de estabilidade. Entretanto, no caso da análise de tendência, o resultado médio de todos os frascos no tempo  $X_i$  pode ser utilizado. Com base neste item e nos trabalhos de Van der Veen e Pauwels<sup>38,45</sup> tais extensões podem ser desenvolvidas de forma bem direta.

Os parâmetros de regressão podem ser calculados a partir das expressões dadas abaixo. No caso do estimador para a inclinação ( $b_1$ ), a seguinte expressão pode ser utilizada:

$$b_1 = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} \quad (6)$$

A estimativa para a intersecção ( $b_0$ ) pode ser calculada a partir de:

$$b_0 = \bar{Y} - b_1 \bar{X} \quad (7)$$

A partir da análise de erro, as expressões para os desvios padrão em  $b_1$  e  $b_0$  podem ser calculadas. O desvio padrão estimado de  $b_1$  é dado por

$$s(b_1) = \frac{s}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}} \quad (8)$$

onde

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - b_0 - b_1 X_i)^2}{n - 2} \quad (9)$$

A variância estimada de  $b_0$  é dada por

$$V(b_0) = V(\bar{Y} - b_1 \bar{X}) = s^2 \left[ \frac{1}{n} + \frac{\bar{X}^2}{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} \right] = \frac{s^2 \sum_{i=1}^n X_i^2}{n \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} \quad (10)$$

onde convém que seja observado que  $b_1$  e  $\bar{Y}$  não estão correlacionados.

Com base no desvio padrão de  $b_1$ , um julgamento pode ser feito. Utilizando-se a Equação 6 e um fator  $t$  apropriado (o número pertinente de graus de liberdade é igual a  $n - 2$ ),  $b_1$  pode ser testado quanto à significância. Assim, se a condição  $|b_1| < t_{0,95, n-2} \cdot s(b_1)$  for confirmada, a inclinação é insignificante e conseqüentemente nenhuma instabilidade foi observada.

A média quadrática devido à regressão é, freqüentemente, indicada como  $SQ(b_1|b_0)$ , a ser lido como “a soma dos quadrados para  $b_1$  após uma estimativa ter sido calculada para  $b_0$ ”. A média quadrática referente a regressão ( $s^2$ ) é uma estimativa para a propriedade indicada por  $\sigma^2_{Y.X}$  e denominada variância referente à regressão.

A razão  $MQ_{reg}:s^2$  pode ser testada quanto à significância utilizando-se as tabelas  $F$ . A TAB. 1 fornece as informações necessárias com respeito aos graus de liberdade. A vantagem de se empregar a tabela de  $F$ , ao invés do método utilizando o teste  $t$ , é dupla: a tabela  $F$  é gerada usualmente pela maioria dos sistemas de software e a tabela  $F$  pode ser imediatamente estendida a outros modelos de regressão, o que a torna mais amplamente aplicável.

TABELA 1 - Equações de análise da variância para regressão linear

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados $SQ$	Quadrado médio $MQ$	$F$
Devido à regressão	1	$\sum_{i=1}^n (\hat{Y}_i - \bar{Y})^2$	$MQ_{reg}$	$F = \frac{MQ_{reg}}{s^2}$
Sobre regressão (residual)	$n - 2$	$\sum_{i=1}^n (Y_i - \hat{Y}_i)^2$	$s^2 = \frac{SQ}{n - 2}$	
Total, corrigido para $\bar{Y}$ médio	$n - 1$	$\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2$		

Onde:  $\hat{Y}_i$  = resultado de cada projeção após aplicação da reta de regressão nos dados;  $\bar{Y}$  é o valor médio das medições da característica do candidato a MRC;  $Y_i$  é cada valor medido da característica do candidato a MRC;  $MQ_{reg}$  é a média quadrática referente à regressão;  $SQ$  é a soma quadrática.

Um estudo de estabilidade inclui os seguintes componentes de incerteza: repetitividade da medição, instabilidade do material, instabilidade do sistema de medição (no projeto clássico), aspectos de reprodutibilidade (por exemplo, operador, equipamento), inclusive calibração (no projeto clássico), homogeneidade entre frascos (em certificações de lote). Por meio dessa lista, pode-se ver que, sempre que possível, convém que o projeto isócrona seja preferido em relação ao clássico, pois ele reduz o número de componentes a serem observados. Em um estudo isócrona típico de estabilidade, permanecem apenas três componentes de incerteza, os quais podem ser separados através de uma Análise da Variância embutida – fator duplo.

Quando há múltiplas temperaturas em um estudo de estabilidade, a estimativa de  $s_{bb}$  obtida para a temperatura de referência será, freqüentemente, a melhor, pois, para essa temperatura, pressupõe-se que o material seja estável. Nas temperaturas em que é evidente que o material não é estável, as alterações do mesmo poderiam afetar a estimativa de  $s_{bb}$  obtida.

Foi adotada a premissa de que a homogeneidade e estabilidade do material são independentes. Este é, freqüentemente, o caso, mas pode haver exceções. Quando há uma considerável heterogeneidade entre frascos, pode-se esperar, também, que a estabilidade do

material será diferente de frasco para frasco, pois a estabilidade do material depende (dentre outros) da composição do mesmo. A presença de algum componente desestabilizador, levemente heterogêneo no lote, também pode constituir uma razão para tal correlação.

#### **4.4.3 Caracterização**

A norma ABNT ISO Guia 34<sup>12</sup> distingue entre quatro abordagens básicas para a caracterização. Elas são implementadas de diversas formas por produtores e órgãos de certificação de MR, da seguinte maneira: medição por meio de um método (primário) único em um único laboratório, medição por meio de dois ou mais métodos de referência independentes em um laboratório, medição por meio de uma rede de laboratórios empregando um ou mais métodos com exatidão demonstrável e uma abordagem com método específico que fornece apenas os valores de propriedade específicos do método, utilizando uma rede de laboratórios.

O aspecto mais importante a ser considerado ao escolher uma abordagem para a caracterização consiste em qual extensão os diferentes componentes de incerteza irão contribuir para a incerteza associada ao valor da propriedade. Além disso, é importante que o valor da propriedade atribuído e sua incerteza sejam demonstráveis.

A escolha da melhor abordagem para a caracterização de um MR depende, dos métodos disponíveis e conseqüentemente dos laboratórios disponíveis e da competência desses laboratórios em analisar o candidato a MRC.

##### **4.4.3.1 Preparação do relatório de certificação e do certificado**

Uma vez o MRC ter sido apropriadamente caracterizado e seus valores certificados, um certificado é elaborado. A norma ABNT ISO GUIA 31<sup>35</sup> fornece os itens que o relatório e o certificado de um MRC devem conter. O certificado do MRC deve, como informação mínima, conter: nome e endereço do produtor, descrição e nome do material, os valores de propriedade e suas incertezas, data de certificação e o tempo de prateleira, uso pretendido e se há alguma restrição de uso, condições de estabilidade, transporte e armazenamento, instruções para o uso correto, método de preparação, declaração da homogeneidade e estabilidade, método de caracterização e a lista de laboratórios participantes do processo de caracterização (quando apropriado).

Alguns produtores de MRC também fornecem em maiores detalhes um relatório sobre a preparação, a caracterização e a certificação do material, contendo

informações adicionais sobre fonte do material, procedimento de preparação detalhado, técnicas utilizadas para os testes de homogeneidade, estabilidade e caracterização e os resultados de medição obtidos pelos laboratórios individualmente e os métodos utilizados.

A rastreabilidade de MRC's pode alcançar a partir de uma cadeia ininterrupta de calibrações ligadas a unidades relevantes da base do sistema SI, até o uso de resultados obtidos a partir de métodos de referência corretamente validados. Em cada caso, o produtor deverá incluir no certificado do MRC a declaração da rastreabilidade indicando os princípios e procedimentos os quais os valores de propriedade estão baseados.

#### 4.5 Importância do elemento mercúrio

Normalmente os elementos tóxicos presentes nos alimentos provêm de fontes naturais, industriais ou podem estar relacionados à ocupação desordenada dos solos em regiões urbanas, agrícolas e de mananciais. O risco potencial destes elementos ao meio ambiente e à saúde humana tem levado as autoridades a estabelecerem rígidos controles sobre sua presença em diferentes produtos.

Segundo a legislação<sup>15,16</sup>, um dos elementos químicos que deve ser controlado nos produtos marinhos é o mercúrio. A presença do metal nos pescados pode provir de diferentes origens. Na Amazônia, por exemplo, sempre se atribui às atividades garimpeiras a responsabilidade pela alta quantidade do metal presente na biota (conjunto de animais e vegetais) e meio ambiente. Estudos recentes, entretanto, mostram indícios da presença do metal como elemento natural do meio ambiente na região<sup>46,47,48</sup>. A exposição ambiental ao Hg via cadeia alimentar, principalmente para consumidores de nível trófico superior, incluindo-se o homem, é significativamente maior, uma vez que este metal apresenta alta toxicidade e capacidade de sofrer biomagnificação ao longo das cadeias tróficas<sup>49,50</sup>.

A exposição humana ao mercúrio pode ser proveniente de fontes naturais (liberação de gás da crosta terrestre, evaporação dos oceanos, queima de combustível fóssil) e/ou artificiais (Hg produzido por mineradoras e refinarias, células de mercúrio na fabricação de soda/cloro, indústria de cosméticos, de despoldamento de madeira, amálgama dentário, ambiente hospitalar e uso de medicamentos). O mercúrio apresenta características particulares que maximizam sua toxidez para os seres humanos. Entre elas pode-se citar sua tendência de formação de ligações covalentes com moléculas biológicas, particularmente com grupos SH<sup>-</sup>, sendo incorporado facilmente pelo sistema nervoso e apresentar elevadas meias vidas biológicas (75 dias para o metilmercúrio e 45 dias para o mercúrio inorgânico) e baixas taxas de eliminação pelo organismo. Essas propriedades podem resultar em um processo de acumulação contínuo levando, rapidamente, a níveis altamente tóxicos. Para mercúrio total os principais locais de deposição são os músculo e o fígado<sup>51</sup>. A oxidação de Hg<sup>0</sup> para Hg<sup>2+</sup> no cérebro permite que este elemento ali se armazene.

Além dos compostos inorgânicos de mercúrio, o mercúrio II forma uma importante classe de compostos organometálicos, os quais requerem atenção especial. Eles se caracterizam pela união do mercúrio a um ou dois átomos de carbono, por meio de ligação do tipo covalente (elétrons compartilhados), para formar moléculas do tipo R-Hg-X e R-Hg-R', em que R e R' representam os grupamentos orgânicos. A ligação carbono-

mercúrio é quimicamente estável, não sendo rompida em água e nem por ácidos ou bases fracos. Sabe-se que os organomercuriais são os derivados mais considerados do ponto de vista toxicológico. Causam uma maior preocupação aqueles que são ligados aos grupamentos alquila de cadeia curta, em que o mercúrio se une aos grupos metila, etila e propila. Algumas vezes, a expressão “metilmercúrio” é adotada para designar os compostos monometilmercuriais.

É importante mencionar que a exposição aos mercuriais estimula a síntese da metalotioneína, que é a proteína transportadora de metais pelo organismo. Nos peixes, a concentração do metal e seus compostos dependem da idade, do tamanho do animal e, principalmente, da sua posição na cadeia trófica (cadeia alimentar). Espécies localizadas no topo desta cadeia, em particular em peixes carnívoros, apresentam geralmente teores mais elevados de mercúrio em seu tecido.

#### **4.6 Método analítico utilizado nos estudos de homogeneidade e estabilidade do material candidato a MRC.**

Conforme citado em 4.4.1 e 4.4.2, um método analítico deve ser selecionado para realizar as determinações dos estudos de homogeneidade e estabilidade do material candidato a material de referência. O método selecionado foi a determinação de mercúrio total (Hg) e metilmercúrio (MeHg) por meio da técnica de Espectrofotometria de Absorção Atômica (AAS) com sistema de injeção em fluxo e geração de vapor frio (FIA-CV-AAS).

##### **4.6.1 Espectrofotometria de Absorção Atômica**

Em espectrofotometria de absorção atômica (AAS - Atomic Absorption Spectrometry) mede-se a absorção (variação de intensidade) de uma radiação eletromagnética, proveniente de uma fonte específica, por átomos gasosos no estado fundamental da amostra. O princípio fundamental da AAS foi enunciado em 1860 por Kirchhoff: "Em condições especiais, todos os corpos podem absorver radiações que eles próprios emitem". Em 1900, Max Planck estabeleceu a lei quântica de absorção e emissão de radiação de um átomo em comprimento de onda definido. Somente em 1955, o físico Alan Walsh propôs o conceito da AAS e o primeiro protótipo do equipamento. A base do conceito é que a maior parte dos átomos em uma chama permanece em seu estado fundamental. Assim, um elemento metálico no estado atômico e de vapor, pela transição de seus elétrons para um nível mais energético, absorve a radiação de um certo comprimento

de onda específico. A quantidade de radiação absorvida está relacionada com a concentração de átomos do elemento no estado fundamental<sup>52</sup>.

Na espectrofotometria de absorção atômica, a correlação entre o sinal analítico, registrado pelo aparelho, e a quantidade do analito na amostra é obtida com poucos estágios intermediários: atomização, transporte, absorção e registro da leitura. Durante a atomização térmica, o analito é convertido à fase gasosa e então é transportado para dentro e para fora do atomizador (FIG. 2). Nesse processo, forma-se uma camada de absorção transiente com um certo número de átomos. A exposição dessa nuvem de átomos a uma radiação de comprimento de onda específico, proveniente de uma fonte primária (lâmpada de cátodo oco), produz a absorção que, na saída do atomizador, irá se transformar em um sinal elétrico no sistema de leitura. Um monocromador separa as linhas espectrais produzidas pela fonte e as que saem do atomizador, e, geralmente, uma fotomultiplicadora (mais recentemente detectores no estado sólido), transforma a radiação não absorvida em corrente elétrica que é amplificada e medida por um amperímetro. Assim, a forma resultante da curva de calibração (curva analítica) dependerá das características particulares de todos esses processos.

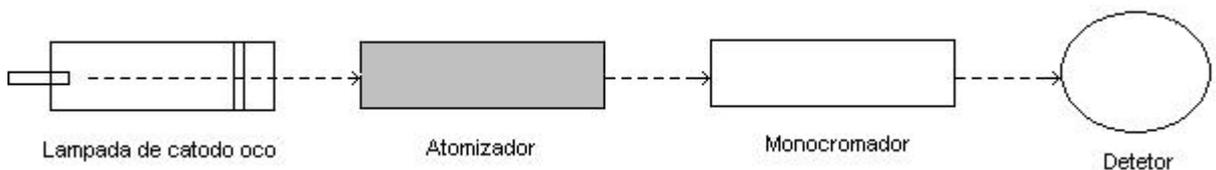


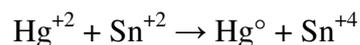
FIGURA 2 - Esquema simplificado de um espectrofotômetro de Absorção Atômica.

A espectrofotometria de absorção atômica é uma das técnicas mais usadas para controle de processos devido a sua rapidez, reprodutibilidade, sensibilidade e exatidão, para determinações de metais em amostra principalmente na forma de solução. Emprega-se absorção atômica com atomização em chama (FAAS) para elementos ao nível de  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (parte por milhão) e termoelétrica em forno de grafite (GF-AAS) ao nível de  $\mu\text{g L}^{-1}$  (parte por bilhão). Em ambas há interferência espectral (emissão e absorção) entre os elementos e, também, da matriz, como ocorre em todas as outras técnicas espectrométricas. As interferências, quando se utiliza forno de grafite, podem ser mais críticas devido às altas temperaturas de trabalho. Assim, muitas vezes necessita-se uma separação prévia dos elementos traços da matriz<sup>53</sup>.

#### 4.6.2 Geração de vapor frio acoplado ao espectrofotômetro de absorção atômica (CVAAS).

O método CVAAS, que foi usado neste trabalho para a determinação de mercúrio total é simples, apresenta boa sensibilidade e baixo limite de detecção ( $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), sendo este método acreditado no INMETRO desde 2007. O método utilizado é uma modificação de Akagi et al<sup>54</sup> e foi devidamente validado. Um resumo do processo de validação da metodologia é mostrado no APÊNDICE A.

A determinação de mercúrio por CVAAS dispensa o uso da chama para a atomização do metal, porque no produto final a ser submetido à operação, o Hg inorgânico é reduzido a seu vapor monoatômico por meio de um agente redutor. Portanto, o método consiste na redução dos íons  $\text{Hg}^{+2}$  a  $\text{Hg}^0$  (estado fundamental), com posterior transporte, através de um fluxo de gás argônio, para uma célula de quartzo colocada na posição do atomizador. Na célula, o vapor de mercúrio absorve parte da radiação emitida por uma lâmpada de catodo oco do elemento mercúrio e assim, através de interpolação em uma curva analítica obtém-se a concentração de mercúrio na amostra. Para reduzir o analito mercúrio ao seu estado metálico pode-se utilizar o borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) ou cloreto estano (SnCl<sub>2</sub>). Na realização das análises, para os estudos de homogeneidade e estabilidade, foi utilizada solução de cloreto estano, com o objetivo de reduzir interferências<sup>55</sup>. A reação de redução que ocorre pode ser explicada pela equação:



Para a determinação de metilmercúrio (MeHg), contudo, há a necessidade de se distinguir o Hg total do MeHg em uma determinada amostra, antes da medida no espectrofotômetro. O procedimento com descrição detalhada da preparação das amostras para determinação deste analito está no item 6.3.3.2. A metodologia utilizada foi baseada nos trabalhos de Horvat<sup>56</sup> e May<sup>57</sup>.

#### **4.7 Seleção do método analítico utilizado na caracterização do material candidato a MRC.**

Vários métodos analíticos podem ser utilizados para a caracterização de materiais de referência, dentre eles podem ser citados: espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), espectrofotometria de absorção atômica com forno de grafite, espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), fluorescência de raios-X, análise por ativação neutrônica instrumental (INAA).

Conforme citado em 4.4.3, existem quatro abordagens para caracterizar um material candidato a material de referência. Neste trabalho optou-se por caracterizar o material por meio de um método (primário) único em um único laboratório e assim, a técnica de diluição isotópica aplicada a espectrometria de massas foi utilizada. Este método é citado na norma ISO Guia 35<sup>13</sup> sendo identificado como método primário de medição apresentando propriedades metrológicas elevadas.

##### **4.7.1 O Espectrômetro de Massas com Fonte de Plasma Indutivo (ICP-MS)**

Um espectrômetro de massas com fonte de plasma indutivo (ICP-MS) é constituído basicamente de 5 partes: sistema de introdução de amostras, fonte de ionização, sistema de focalização, analisador de massa e sistema de detecção de íons. A representação de um ICP-MS é ilustrada na FIG. 3.

Para a introdução de amostras, utiliza-se um nebulizador, o qual é direcionado à fonte do plasma. A amostra é introduzida finamente dispersa em um plasma de argônio a uma temperatura de 6000 a 8000K. A essa temperatura 99% dos elementos são ionizados com 100% de eficiência. Um gerador de radiofrequência aplicado sob um fluxo de argônio é o responsável pela geração do plasma.

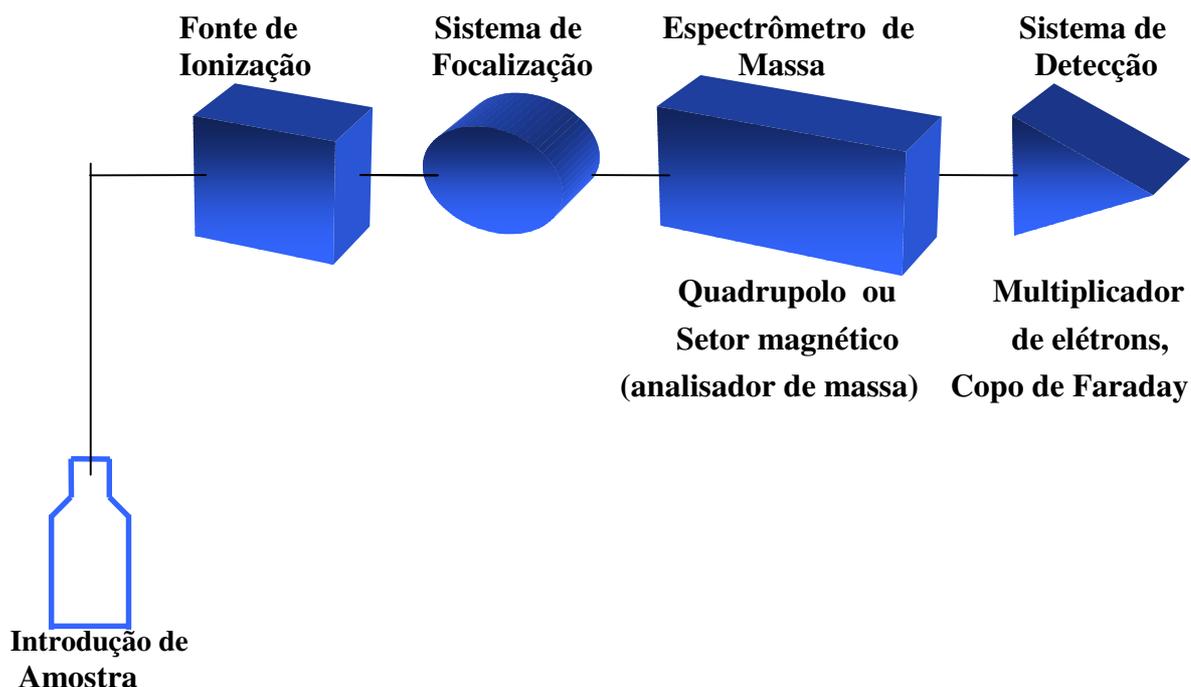


FIGURA 3. Representação de um ICP-MS

#### 4.7.2 Diluição isotópica aplicada a espectrometria de massas (IDMS).

O princípio da técnica de IDMS é surpreendentemente simples. Uma amostra com conhecida composição isotópica do elemento de interesse, mas com concentração desse elemento desconhecida, é misturada com uma quantidade (em massa) conhecida de traçador do elemento. Este traçador contém o elemento de interesse em uma composição isotópica diferente da existente na amostra, geralmente enriquecido no isótopo natural de menor abundância. Após a completa mistura da amostra e do traçador, geralmente chamada de mistura amostra-traçador ou amostra diluída isotopicamente, a amostra ganha uma nova razão isotópica entre a razão isotópica da amostra e aquela do traçador. Esta mistura de razão isotópica reflete diretamente a concentração do analito (elemento de interesse) na amostra. O princípio é demonstrado na FIG. 4 para o exemplo com antimônio<sup>58</sup>.

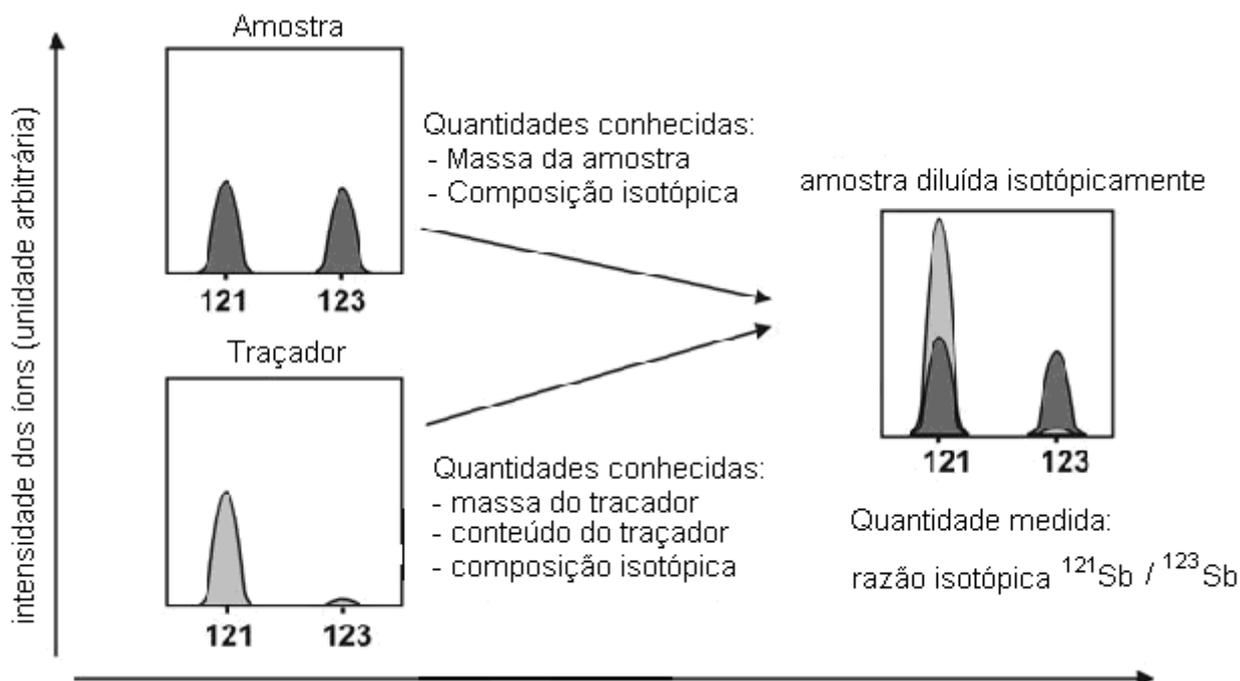


FIGURA 4 - Princípio esquemático para IDMS demonstrado para antimônio

As etapas básicas envolvidas no procedimento de análise por diluição isotópica são:

- Preparação e calibração do traçador isotópico;
- Adição de uma alíquota da solução do traçador isotópico de concentração conhecida a uma alíquota de amostra. Em geral esta mistura deve ser realizada com base em peso para se obter medidas precisas.
- Dissolução da amostra de forma adequada e uma mistura completa da solução resultante, para assegurar equilíbrio isotópico entre o traçador e a amostra.
- Medida da composição isotópica por espectrometria de massas e cálculo de concentração do elemento de interesse da amostra.

Para obter a concentração do elemento de interesse na amostra existem várias equações que podem ser utilizadas, porém, os parâmetros envolvidos são os mesmos. Neste trabalho a equação abaixo foi utilizada<sup>59</sup>.

$$C_s = C_{sp} \cdot \frac{W_{sp}}{W_s} \cdot \frac{A_{r_s}}{A_{r_{sp}}} \cdot \frac{A_{sp}}{A_s} \cdot \frac{R_m - R_{sp}}{1 - R_m \cdot R_s} \quad (11)$$

Onde:  $C_s$  = Concentração desconhecida do elemento na amostra ( $\mu\text{g g}^{-1}$ );  $C_{sp}$  = concentração do elemento no traçador (spike  $\rightarrow$  sp) ( $\mu\text{g g}^{-1}$ );  $W_{sp}$  = massa do traçador (g);

$W_s$  = massa da amostra (g);  $A_{rs}$  = Massa atômica do elemento na amostra;  $A_{rsp}$  = Massa atômica do elemento referência no traçador;  $A_{sp}$  = Abundância do isótopo de referência (enriquecido) no traçador (isótopo a) (%);  $A_s$  = Abundância do isótopo na amostra (isótopo b);  $R_m$  = Razão isotópica (isótopo b /isótopo a) na mistura;  $R_{sp}$  = Razão isotópica (isótopo b /isótopo a) no traçador;  $R_s$  = Razão isotópica (isótopo a /isótopo b) na amostra.

A técnica de diluição isotópica apresenta várias vantagens, quando comparada a outros métodos analíticos:

a) O resultado final para as análises depende somente da razão isotópica, pois a razão permanece inalterada, mesmo que haja perda de material durante a preparação.

b) As abundâncias isotópicas e a concentração do elemento a ser analisado podem ser obtidas simultaneamente.

c) A técnica, além de ser extremamente sensível na medida de elementos em nível de traços, apresenta grande precisão e exatidão, não exigindo calibração constante com padrões. A precisão é da ordem de 1% para a maioria dos elementos que podem ser determinados quando equipamentos HRICP-MS são utilizados<sup>60</sup>.

As medidas de razões isotópicas quando se utiliza a espectrometria de massas sofre um desvio sistemático denominado de discriminação de massa, devido ao efeito de fracionamento isotópico. Este efeito ocorre em consequência dos isótopos mais leves de um determinado elemento serem preferencialmente evaporados e ionizados, em relação às espécies mais pesadas. Para a correção deste efeito pode-se utilizar a técnica de normalização isotópica<sup>61</sup>, quando o elemento possui outros isótopos cujas razões são bem conhecidas. Quando não é possível utilizar a técnica de normalização, empregam-se padrões de composição isotópica exatamente conhecida. Para o caso do urânio, por exemplo, o padrão isotópico geralmente empregado é o NIST U 500. Assim, o fator de correção que é determinado experimentalmente é aplicado aos valores medidos das razões isotópicas do elemento.

Entretanto, quando se utiliza a técnica de diluição isotópica, o efeito de fracionamento torna-se desprezível se a solução do traçador é calibrada pela mesma técnica<sup>62,63</sup>. Para a determinação da concentração do elemento de interesse no traçador a técnica de diluição isotópica é aplicada, utilizando-se um padrão do elemento a ser analisado, quimicamente puro, estável e com composição isotópica bem definida e diferente do traçador. Esta técnica é geralmente chamada de Diluição isotópica reversa. A concentração do elemento no traçador é calculada por meio da expressão<sup>64</sup>:

$$C_t = C_p \frac{m_p}{m_t} \frac{M_t}{M_p} \frac{A_p}{A_t} \left( \frac{R_m - R_p}{R_t - R_m} \right) \quad (12)$$

onde:

$C_t$ ,  $C_p$  = concentrações do elemento nas soluções do traçador e do padrão de calibração, respectivamente.

$m_p$ ,  $m_t$  = massas das alíquotas das soluções do padrão de calibração e do traçador, respectivamente.

$M_t$ ,  $M_p$  = pesos atômicos do elemento no traçador e no padrão, respectivamente.

$A_p$ ,  $A_t$  = abundâncias do isótopo de referência no padrão e no traçador, respectivamente.

$R_m$ ,  $R_p$  e  $R_t$  = razões entre os isótopos de referência na mistura, no padrão e no traçador, respectivamente.

## 5 CONSIDERAÇÕES SOBRE INCERTEZA ASSOCIADA AOS PROCESSOS DE MEDIÇÃO

Os principais meios de avaliação da qualidade dos resultados obtidos por um determinado laboratório consistem em: uso de procedimentos validados, ensaios de controle, participação em ensaios de proficiência promovidos por provedores acreditados e independentes e, por fim, a obtenção da acreditação segundo a norma ABNT NBR ISO/IEC 17025<sup>14</sup>. A norma exige a estimativa da incerteza associada nos resultados obtidos por laboratórios de calibração e de ensaios. Sem essa indicação, os resultados de medições não podem ser comparados, sejam entre eles ou com os valores de referência fornecidos.

A palavra “incerteza” significa dúvida e assim, no sentido mais amplo, “incerteza de medição” significa dúvida sobre a qualidade do resultado de uma medição. A definição formal do termo incerteza de medição segundo o Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM)<sup>1</sup> é “parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando, com base nas informações utilizadas”. As definições de vários termos metrológicos gerais e relevantes podem ser encontradas no mesmo guia, ou também no “Guia para a expressão da incerteza de medição”<sup>42</sup>

Na prática, existem muitas fontes possíveis de incerteza em uma medição, entre elas pode-se destacar: definição incompleta do mensurando, amostragem não representativa, valores inexatos dos padrões de medição e materiais de referência, entre outras. Essas fontes não são necessariamente independentes e algumas podem contribuir sobre outras e causar variações nas observações repetidas do mensurando sob condições idênticas.

Os componentes da incerteza são agrupados em duas categorias baseadas no método de avaliação: Tipo A, método de avaliação pela análise estatística de uma série de observações da grandeza medida, ou seja, quando são executadas medições sob condições de repetitividade e Tipo B, método de avaliação por outros meios que não dependam de um conjunto de observações, ou seja, a estimativa da incerteza padronizada neste tipo pode ser feita assumindo-se que a grandeza de entrada tem uma determinada distribuição e um intervalo de dispersão. Essas distribuições podem ser: retangular, triangular, normal, etc. Podem ser citados como exemplos desse último tipo de categoria os dados obtidos de certificado de calibração de equipamentos e valores de incerteza de concentrações fornecidos em certificados de materiais de referência.

A incerteza de medição da concentração de um analito em uma determinada matriz, por exemplo, é expressa na forma de desvio padrão, chamada de incerteza padrão. Entretanto, a incerteza total do método proposto é a soma de todas as incertezas geradas em cada passo do método pelos diversos componentes do processo de medição. Um experimento bem planejado pode, em muito, facilitar as avaliações confiáveis da incerteza e é um requisito importante na organização das atividades de medição.

Os modelos de cálculos existentes, assim como os guias para cálculos de incerteza<sup>42,43</sup> contribuem de forma essencial para o entendimento e avaliação das incertezas nos laboratórios químicos, porém, deve-se sempre levar em conta a habilidade e experiência profissional dos especialistas em suas variadas áreas.

Com o objetivo de identificar as possíveis fontes de incerteza na medição das grandezas avaliadas, os procedimentos adotados, para cada etapa, devem ser detalhados e estruturados de forma a garantir a abrangência necessária para entendimento e conhecimento do processo de medição e evitar a duplicidade de fontes de incerteza. Normalmente, este objetivo é atingido utilizando-se o diagrama de causa-e-efeito, também conhecido como diagrama de Ishikawa ou espinha de peixe. O uso do diagrama facilita a resolução de problemas, associando os sintomas e suas causas, até a solução. O uso deste diagrama é extensamente descrito no guia Eurachem<sup>43</sup>. As etapas seguintes ao de identificação das fontes compreendem a análise e a quantificação das fontes de incerteza finalizando com o cálculo da incerteza combinada e conseqüentemente com o valor da incerteza expandida do método analítico.

### **5.1 Incerteza associada ao processo de medição por meio da técnica FIA-CV-AAS**

As etapas envolvidas na determinação de mercúrio (Hg) total por FIA-CV-AAS são: preparação da amostra, preparação da solução padrão, preparação das soluções da curva analítica, calibração e análise das amostras no equipamento. A FIG 5 mostra a interação dessas etapas.

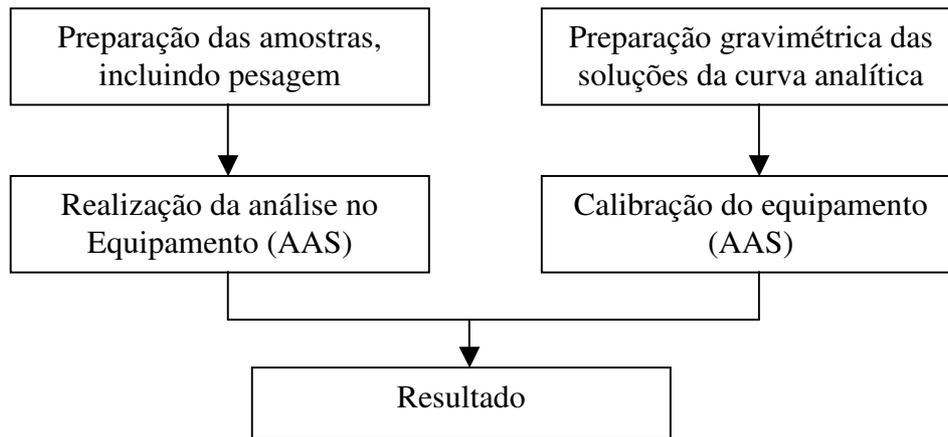


FIGURA 5 - Fluxograma das etapas envolvidas no processo de medição por meio da técnica FIA-CV-AAS

A relação das variáveis no cálculo do mensurando é demonstrada através da equação abaixo:

$$C_{Hg} = \frac{C_o \times m_f}{\frac{R \times m_a}{1000}} \quad \text{ou} \quad C_{Hg} = \frac{C_o \times m_f}{R \times m_a \times 1000} \quad (13)$$

Onde  $C_{Hg}$  = Concentração de mercúrio (Hg) na amostra (em  $\mu\text{g g}^{-1}$ ),  $C_o$  = concentração de Hg encontrada na alíquota analisada (em  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ),  $m_f$  = massa final, em gramas, de amostra (diluição final),  $R$  = taxa de recuperação obtida pela análise do material de referência e  $m_a$  = massa de amostra utilizada, em gramas.

Como citado acima o diagrama de causa-e-efeito é elaborado com o propósito de identificar as fontes de incerteza. A linha horizontal central mostrada na FIG. 6 é o resultado da análise, isto é, a concentração de Hg em  $\mu\text{g g}^{-1}$  ou ainda, é a especificação do mensurando – a grandeza a ser medida. As ramificações da linha principal são as causas que controlam o resultado.

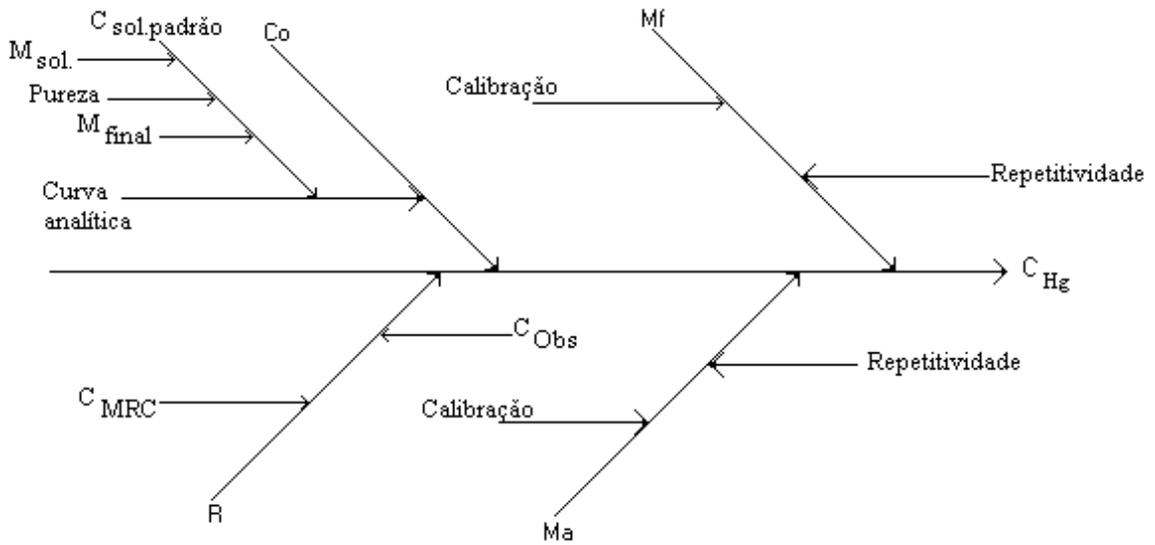


FIGURA 6 - Diagrama de causa e efeito das fontes de incerteza associadas ao processo de medição de Hg por meio da técnica FIA-CV-AAS.

### 5.1.1 Análise das fontes de incerteza

#### $C_o$ : concentração de Hg encontrada na alíquota analisada (em $\mu\text{g kg}^{-1}$ )

Na figura 6, observa-se que as contribuições para a incerteza associada com a concentração do analito na solução são: a) a aplicação da função calibração, obtida a partir de uma série de soluções padrão analisadas e suas respectivas absorvâncias, obtendo dessa forma, a partir de interpolação, a resposta da concentração do analito e b) a incerteza da solução padrão estoque utilizada na preparação dos “pontos” da curva analítica, considerando-se as massas envolvidas e a pureza do padrão.

Para cada lote de amostras, uma curva analítica é plotada, com uma nova série de soluções preparada (seis soluções). O procedimento de análise destas soluções deve ser realizado, no mínimo, por três vezes, ou seja, serão obtidos três resultados para cada solução da curva analítica. Esse número de repetições é utilizado para o cálculo da incerteza associada.

A equação, segundo Guia Eurachem<sup>43</sup>, para calcular a incerteza na concentração do analito na alíquota analisada é:

$$u(C_o) = \frac{S}{B_1} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m} + \frac{(C_o - \bar{c})^2}{Q_{xx}}} \quad (14)$$

Onde:

S = desvio padrão residual, dado por:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^m (A_j - (B_0 + B_1 C_i))^2}{m - 2}} \quad (15)$$

Sendo  $A_j$  = medida de absorvância de cada solução utilizada na curva analítica;  $B_0$  = coeficiente linear da função calibração;  $B_1$  = coeficiente angular da função calibração;  $C_i$  = concentração real de cada solução utilizada na curva analítica;  $m$  = número total de medições realizadas para a calibração do instrumento;

$n$  = número de medições realizadas para determinar  $C_o$

$C_o$  = concentração elementar estimada do analito nas soluções amostra (em  $\mu\text{g kg}^{-1}$ )

$Q_{xx}$  = somatório dado por:

$$Q_{xx} = \sum_{i=1}^m (c_j - \bar{c})^2 \quad (16)$$

Onde:

$c_j$  = concentração medida de cada solução utilizada na curva analítica.  $c_j$  é obtida através da equação da curva analítica

$\bar{c}$  = valor médio de concentração das soluções padrão utilizadas na calibração

Para preparar os “pontos” da curva analítica, duas diluições são realizadas a partir da solução padrão estoque de mercúrio. A solução padrão estoque é preparada a partir da pesagem do padrão sólido de HgO. Este padrão sólido tem uma pureza conhecida e informada pelo fabricante. Dessa forma, as contribuições de incerteza na preparação da solução padrão estoque são as atividades de pesagem (balança utilizada) e a pureza do padrão.

Então, a incerteza da solução padrão estoque é calculada por:

$$\mu_{estoque} = C_{estoque} \times \sqrt{\left(\frac{\mu_P}{P}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{m_p}}{m_p}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{M_f}}{M_f}\right)^2} \quad (17)$$

onde:  $C_{estoque}$  é a concentração calculada da solução padrão estoque,  $\mu_P$  é a incerteza da pureza (fornecida pelo fabricante),  $P$  é o valor da pureza do padrão,  $\mu_{m_p}$  e  $\mu_{M_f}$  é a incerteza da massa utilizada do padrão sólido e incerteza da massa da solução final preparada do padrão, respectivamente. Estas incertezas são calculadas da mesma maneira da incerteza da

massa de amostra e massa final mostradas abaixo, pois as contribuições são as mesmas, ou seja, repetitividade e calibração da balança utilizada.  $m_p$  é a massa utilizada do padrão e  $M_f$  é a massa final da solução preparada.

Como informado acima, duas diluições são realizadas a partir da solução padrão estoque para somente depois, preparar os pontos da curva. Estas soluções diluídas tem concentrações iguais a  $10 \mu\text{g g}^{-1}$  (10 ppm) e  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  (100 ppb).

As incertezas das soluções diluídas são calculadas conforme equações:

$$\mu_{C_{10}} = C_{10} \times \sqrt{\left(\frac{\mu_{\text{estoque}}}{C_{\text{estoque}}}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{m_p}}{m_p}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{M_f}}{M_f}\right)^2} \quad (18)$$

$$\mu_{C_{100}} = C_{100} \times \sqrt{\left(\frac{\mu_{C_{10}}}{C_{10}}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{M_t}}{M_t}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{M_f}}{M_f}\right)^2} \quad (19)$$

onde:  $C_{10}$  e  $C_{100}$  são as concentrações calculadas para as soluções de  $10 \mu\text{g g}^{-1}$  e  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ ,  $\mu_{M_t}$  e  $\mu_{M_f}$  é a incerteza da massa transferida para preparação das soluções e incerteza da massa da solução final preparada, respectivamente. Estas incertezas são calculadas da mesma maneira da incerteza da massa de amostra e massa final mostradas abaixo, pois as contribuições são as mesmas, ou seja, repetitividade e calibração da balança utilizada.  $M_t$  é a massa transferida de cada solução (no caso da solução de  $10 \mu\text{g g}^{-1}$  é a massa da solução padrão estoque e no caso da solução de  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  é a massa da solução de  $10 \mu\text{g g}^{-1}$ ) para obter as diluições e  $M_f$  é a massa final de cada solução preparada.

#### **$m_f$ : massa final de amostra (diluição final) (em g)**

A amostra depois de dissolvida e resfriada é diluída até a massa aproximada de 20 g. Nesta atividade contribuiram na avaliação das incertezas associadas o efeito da repetitividade e da calibração da balança utilizada.

A variabilidade (repetitividade) do resultado da medição, obtida através de pesagens sucessivas, normalmente é fornecida no catálogo do fabricante do equipamento. Nessa etapa, contudo, a contribuição da repetitividade na incerteza dessa medição é determinada através do desvio padrão obtido de verificações realizadas diariamente na balança utilizada, com padrões calibrados. Essa repetitividade consta de gráficos de controle construídos a partir dessa verificação. Esses gráficos são parte integrante do sistema de gestão da qualidade do laboratório.

A incerteza de calibração da balança utilizada é verificada através dos dados do certificado de calibração da mesma.

Finalmente, os componentes de incerteza de medição da massa são combinados para fornecer a incerteza padrão combinada,  $u_c(m_f)$ , da massa final através da equação:

$$u(m_f) = \sqrt{(u_1)^2 + (u_2)^2} \quad (20)$$

Onde  $\mu_1$ =incerteza da repetitividade, obtida através do desvio padrão informado no gráfico de controle da balança plotado no laboratório,  $\mu_2$  = incerteza obtida do certificado de calibração da balança.

### **R: taxa de recuperação obtida pela análise do MRC**

O material de referência certificado (MRC) designado como Dorm-2 é utilizado para verificar a taxa de recuperação da metodologia. A preparação consiste em pesagem de uma massa previamente estabelecida, dissolvida em meio ácido e posteriormente diluída até uma massa final.

A solução inicial do MRC preparada tem incerteza ( $\mu_{sol}$ ) a partir dos dados obtidos do certificado do MRC e das incertezas da massa utilizada do MRC e da massa final da solução preparada.

Assim, com os dados obtidos utiliza-se a equação:

$$\mu_{sol} = C_{sol} \times \sqrt{\left(\frac{\mu_{MRC}}{C_{MRC}}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{M_{MRC}}}{M_{MRC}}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{Mf}}{Mf}\right)^2} \quad (21)$$

Onde:  $C_{sol}$  = concentração calculada da solução do MRC preparada,  $\mu_{MRC}$  = incerteza de Hg no material Dorm-2, informada no certificado,  $C_{MRC}$  = concentração de Hg no material Dorm-2, informada no certificado,  $\mu_{M_{MRC}}$  e  $\mu_{Mf}$  é incerteza na massa pesada do MRC e incerteza da massa da solução final preparada, respectivamente, (calculadas da mesma maneira da incerteza da massa de amostra e massa final).  $M_{MRC}$  é a massa pesada do MRC utilizada na preparação da solução e  $M_f$  é a massa final da solução preparada.

A partir da análise da solução preparada obtém-se a concentração de Hg e compara-se com a concentração calculada. Dessa maneira calcula-se o valor de  $R_m$  dividindo-se  $C_{obs}$  (concentração observada na análise) por  $C_{MRC}$  (concentração de Hg no material Dorm-2, informada no certificado).

A incerteza da recuperação é calculada a partir dos dados de concentração calculada e incerteza da solução preparada, desvio padrão das medidas da solução analisada, concentração observada (obtida) e número de medidas realizado, através da equação:

$$\mu_{Rm} = R_m \times \sqrt{\left(\frac{\mu_{sol}}{C_{sol}}\right)^2 + \frac{S_{obs}^2}{n \times C_{obs}^2}} \quad (22)$$

Onde  $R_m$  = taxa de recuperação ( $R_m = C_{obs}/ C_{MRC}$ ),  $\mu_{sol}$  = incerteza da solução do MRC preparada,  $C_{sol}$  = concentração calculada (esperada) da solução do MRC preparada,  $S_{obs}^2$  = desvio padrão das medidas realizadas, ao quadrado,  $C_{obs}^2$  = concentração observada (real) da solução do MRC analisada, ao quadrado e  $n$  = número de medidas realizadas.

#### **$m_a$ : massa de amostra utilizada (em g)**

A amostra é inicialmente pesada sob um substrato de papel e transferida para balão de vidro com capacidade de 100 mL. Nesta atividade contribuíram na avaliação das incertezas associadas o efeito da repetitividade e da calibração da balança utilizada.

A variabilidade (repetitividade) do resultado da medição, obtida através de pesagens sucessivas, normalmente é fornecida no catálogo do fabricante do equipamento. Nessa etapa, contudo, a contribuição da repetitividade na incerteza dessa medição é determinada através do desvio padrão obtido de verificações realizadas diariamente na balança utilizada, com padrões calibrados. Esta repetitividade consta de gráficos de controle construídos a partir dessa verificação.

A incerteza de calibração da balança utilizada é verificada através dos dados do certificado de calibração da mesma. Finalmente, os componentes de incerteza de medição da massa são combinadas para fornecer a incerteza padrão combinada  $u_c(m_f)$  da massa final através da equação 20:

$$u(m_f) = \sqrt{(u_1)^2 + (u_2)^2}$$

Onde  $\mu_1$ =incerteza da repetitividade, obtida através do desvio padrão informado no gráfico de controle da balança plotado no laboratório,  $\mu_2$  = incerteza obtida do certificado de calibração da balança.

### 5.1.2 Quantificação das Incertezas, cálculo da incerteza combinada e expandida

O cálculo da incerteza padrão para cada fonte é realizado conforme fórmulas apresentadas anteriormente. Para facilitar os cálculos envolvidos, planilhas eletrônicas, em Excel, foram elaboradas e estão disponíveis.

A incerteza combinada para a concentração de mercúrio é estimada através da equação:

$$u_{C_{Hg}} = C_{Hg} \times \sqrt{\left(\frac{u(C_o)}{C_o}\right)^2 + \left(\frac{u(Sol_{100ppb})}{Sol_{100ppb}}\right)^2 + \left(\frac{u(m_f)}{m_f}\right)^2 + \left(\frac{u(R)}{R}\right)^2 + \left(\frac{u(m_a)}{m_a}\right)^2} \quad (23)$$

A incerteza expandida (U) é obtida pela multiplicação da incerteza combinada pelo fator de abrangência k. O valor do fator utilizado é geralmente igual a 2, para um nível de confiança de 95%. Portanto, a incerteza expandida é:

$$U = u_c \times 2 \quad (24)$$

Então, a concentração de mercúrio com incerteza associada é:

$$C_{Hg} = x \pm U \mu\text{g g}^{-1}$$

Para k=2, com 95% de confiança.

## 5.2 Incerteza associada ao processo de medição por meio da técnica IDMS

Segundo Vogl<sup>58</sup>, a existência de uma equação clara e sem ambiguidade em IDMS que fornece a relação entre resposta do instrumento e resultado analítico é uma enorme vantagem ao compor a indicação das fontes de incerteza. Assim, a incerteza pode ser facilmente calculada utilizando os guias ISO e EURACHEM<sup>42,43</sup>. Exemplos para cálculos de incerteza em resultados por IDMS podem ser encontrados na literatura<sup>65,66,67</sup>.

Conforme citado anteriormente, a primeira etapa consiste na elaboração da relação das variáveis envolvidas no cálculo do resultado final, ou seja, da equação envolvida. Dessa forma, a equação utilizada em IDMS foi:

$$C_s = C_{sp} \cdot \frac{W_{sp}}{W_s} \cdot \frac{A_{r_s}}{A_{r_{sp}}} \cdot \frac{A_{sp}}{A_s} \cdot \frac{R_m - R_{sp}}{1 - R_m \cdot R_s}$$

### 5.2.1 Análise das fontes de incerteza

#### Concentração do elemento no traçador - $C_{sp}$

Para aquele traçador fornecido em solução com concentração exata e sua incerteza informada no certificado proveniente do produtor ou fornecedor, a equação 25 é utilizada para obter a concentração do elemento no traçador, a partir da diluição da solução original (fornecida).

$$C_{sp} = \frac{C_{original} \times M_{pesada}}{M_{final}} \quad (25)$$

onde:  $C_{original}$  = concentração da solução original, informada no certificado proveniente do produtor;  $M_{pesada}$  = massa pesada da solução original (g) e  $M_{final}$  é a massa obtida da diluição da solução original (g).

A incerteza na solução preparada por diluição é obtida através da equação:

$$\mu_{sp} = C_{sp} \times \sqrt{\left(\frac{u_{original}}{C_{original}}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{M_{pesada}}}{M_{pesada}}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{M_{final}}}{M_{final}}\right)^2} \quad (26)$$

onde:  $u_{original}$  é a incerteza informada no certificado proveniente do produtor ou fornecedor;  $\mu_{M_{pesada}}$  e  $\mu_{M_{final}}$  é a incerteza da massa utilizada da solução original do traçador e incerteza da massa da solução final preparada, respectivamente. Estas últimas incertezas são calculadas da mesma maneira da incerteza das massas do traçador e da amostra mostradas abaixo, pois as contribuições são as mesmas, ou seja, repetitividade e calibração da balança utilizada.

Para aquele traçador fornecido no estado sólido, após a digestão e diluição do mesmo e ainda diluições sucessivas, as equações 27 e 28 são utilizadas para calcular a incerteza associada à preparação:

$$\mu_{estoque} = C_{estoque} \times \sqrt{\left(\frac{\mu_P}{P}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{m_p}}{m_p}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{Mf}}{Mf}\right)^2} \quad (27)$$

onde:  $C_{estoque}$  é a concentração calculada da solução estoque do traçador sólido;  $\mu_P$  é a incerteza da pureza (fornecida pelo produtor ou fornecedor);  $P$  é o valor da pureza do traçador;  $\mu_{m_p}$  e  $\mu_{Mf}$  é a incerteza da massa utilizada do traçador sólido e incerteza da massa da solução final preparada, respectivamente. Caso o valor da pureza não seja fornecido,

elimina-se o primeiro termo da equação dentro da raiz. A incerteza da diluição da solução estoque é calculada através da equação:

$$\mu_{C_{10}} = C_{10} \times \sqrt{\left(\frac{\mu_{estoque}}{C_{estoque}}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{m_t}}{m_t}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{Mf}}{Mf}\right)^2} \quad (28)$$

onde:  $C_{10}$  é a concentração calculada para uma solução de  $10 \mu\text{g g}^{-1}$  (por exemplo);  $\mu_{m_t}$  e  $\mu_{Mf}$  é a incerteza da massa transferida para preparação da solução e incerteza da massa da solução final preparada, respectivamente.  $m_t$  é a massa transferida para preparação da solução diluída e  $Mf$  é a massa final, em gramas.

### **Massa do traçador - $W_{sp}$ e massa da amostra - $W_s$**

Na atividade de pesagem de alíquotas do traçador e de amostra contribuem na avaliação das incertezas associadas o efeito da repetitividade e da calibração da balança utilizada.

A variabilidade (repetitividade) do resultado da medição, obtida através de pesagens sucessivas, normalmente é fornecida no catálogo do fabricante do equipamento. Porém, a contribuição da repetitividade na incerteza dessa medição é determinada através do desvio padrão obtido de verificações realizadas diariamente na balança utilizada, com padrões calibrados, pois essa atividade é rotina do sistema da qualidade implantado em nossos laboratórios. Essa repetitividade consta de gráficos de controle construídos a partir dessa verificação.

A incerteza de calibração da balança utilizada é verificada através dos dados do certificado de calibração da mesma.

Finalmente, os componentes de incerteza de medição da massa são combinados para fornecer a incerteza padrão combinada,  $u_c(m_f)$ , da massa final através da equação 20:

$$u(m_f) = \sqrt{(u_1)^2 + (u_2)^2}$$

Onde  $\mu_1$ =incerteza da repetitividade, obtida através do desvio padrão informado no gráfico de controle da balança plotado no laboratório,  $\mu_2$  = incerteza obtida do certificado de calibração da balança.

### **Massa atômica da amostra - $A_{rs}$ e massa atômica do traçador - $A_{rsp}$**

As incertezas das massas atômicas de cada isótopo envolvido na técnica de diluição isotópica podem ser obtidas diretamente do certificado do traçador ou do padrão

fornecido, ou ainda, por tabelas específicas de massas atômicas, contanto que estas sejam devidamente referendadas.

**Abundância (at%) do isótopo enriquecido no traçador -  $A_{sp}$  e Abundância (at%) do isótopo na amostra -  $A_s$**

As incertezas das abundâncias de cada isótopo envolvido na técnica de diluição isotópica podem ser obtidas diretamente do certificado do traçador ou do padrão fornecido, ou ainda, por tabelas específicas de abundâncias, contanto que estas sejam devidamente referendadas.

**Razão isotópica na mistura -  $R_m$ , Razão isotópica no traçador -  $R_{sp}$  e Razão isotópica na amostra -  $R_s$**

As incertezas das razões isotópicas medidas são obtidas utilizando-se dos valores de desvio padrão obtidos durante as medidas.

**5.2.2 Quantificação das Incertezas, cálculo da incerteza combinada e expandida.**

O cálculo da incerteza padrão para cada fonte é realizado conforme fórmulas apresentadas anteriormente. Para facilitar os cálculos envolvidos, planilhas eletrônicas, em Excel, foram elaboradas e estão disponíveis. Os resultados estão mostrados no item 7.7.

A incerteza combinada para a concentração do elemento é estimada através da equação:

$$\mu_{c_{c_s}} = C_s \times \sqrt{\left(\frac{\mu_{C_{sp}}}{C_{sp}}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{W_{sp}}}{W_{sp}}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{W_s}}{W_s}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{A_s}}{A_s}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{A_{sp}}}{A_{sp}}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{A_{sp}}}{A_{sp}}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{A_s}}{A_s}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{R_m}}{R_m}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{R_{sp}}}{R_{sp}}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{R_s}}{R_s}\right)^2} \quad (29)$$

A incerteza expandida (U) é obtida pela multiplicação da incerteza combinada pelo fator k. O valor do fator utilizado é geralmente igual a 2, para um nível de confiança de 95%. Portanto, a incerteza expandida é:

$$U = u_c \times 2$$

Então, a concentração do elemento (x) determinada por meio da técnica de diluição isotópica com incerteza associada é:

$$C = x \pm U \mu\text{g g}^{-1}$$

Para k=2, com 95% de confiança.

### 5.3 Incerteza do valor certificado

Conforme citado na norma ISO Guia 35<sup>13</sup>, um dos requisitos básicos para atribuir a incerteza do valor certificado consiste em que sejam incluídos todos os fatores que podem contribuir de forma significativa para a incerteza associada aos valores de propriedades do MRC. Portanto, para ser completa, recomenda-se que a incerteza padrão combinada em um material de referência considere que a homogeneidade e ambas as estabilidades a longo e a curto prazo também desempenham um papel importante à caracterização do lote. Assim, a incerteza associada ao valor de propriedade de um MRC pode ser expressa por:

$$\mu_{MRC} = \sqrt{\mu_{car}^2 + \mu_{bb}^2 + \mu_{lts}^2 + \mu_{sts}^2} \quad (30)$$

onde:  $\mu_{car}^2$  é a incerteza de caracterização do analito, obtida através da técnica IDMS;  $\mu_{bb}^2$  é a incerteza padrão da homogeneidade entre frascos;  $\mu_{lts}^2$  e  $\mu_{sts}^2$  são as incertezas padrão de estabilidade a longo e a curto prazo, respectivamente.

Para se obter a incerteza expandida U, para a qual se pressupõe o intervalo da propriedade ( $x - U$ ,  $x + U$ ) a incerteza combinada é multiplicada por um fator de abrangência k, conforme mostrado na equação 24. Recomenda-se que esse fator de abrangência se baseie no nível de confiança igual a 95%.

Os valores de incerteza expandida associados ao valor certificado dos analitos estão mostrados no item 7.9, página 89.

#### 5.3.1 Estimativa de incerteza padrão da homogeneidade entre frascos

Conforme citado no item 4.4.1, a estimativa da incerteza da homogeneidade, a partir dos cálculos com ANOVA, sendo equivalente ao desvio padrão entre frascos, é função dos valores da média quadrática entre os frascos ( $MQ_{entre}$ ) e dentro dos frascos ( $MQ_{dentro}$ ).

Dessa forma, para mercúrio total, onde utilizou-se ANOVA, a estimativa da incerteza da homogeneidade foi calculada através da equação 1 (página 17).

Para metilmercúrio, onde a aplicação da ANOVA não foi possível em virtude da não repetitividade do método analítico utilizado, conforme explicado em 4.4.1 e 6.3.1, a estimativa da incerteza da homogeneidade foi calculada através da equação 2 (página 17). Os resultados das estimativas das incertezas são mostrados nos itens 7.3.1 e 7.3.2.

### 5.3.2 Estimativa de incerteza padrão devidas à estabilidade

Os dois tipos de estudo de estabilidade a serem considerados, a curto prazo e a longo prazo, são igualmente importantes. Entretanto, o estudo de estabilidade a curto prazo, associado a condições de transporte, é menos comum. O comportamento da amostra durante o transporte sob condições especificadas podem diferir daquelas condições de estocagem e quando o produtor especifica anteriormente as condições apropriadas para o transporte das amostras reduz, efetivamente, o componente de incerteza associado a esse estudo. Dessa forma, esse item se refere à estimativa da incerteza padrão associada à estabilidade a longo prazo.

O estudo de estabilidade a longo prazo está associado ao tempo de prateleira do MRC e usualmente é implementado nos projetos de certificação.

Empregando-se a abordagem mostrada na norma ISO Guia 35<sup>13</sup>, a estimativa da incerteza devida à estabilidade a longo prazo ( $u_{lts}$ ) é obtida multiplicando-se o valor do erro padrão ( $s(b_1)$ ) da variável X obtido na análise de regressão linear dos dados de estabilidade para o analito testado por um tempo adequado em meses, conforme a equação:

$$\mu_{lts} = s_{b_1} \times X$$

Onde  $s(b_1)$  é o valor do erro padrão e X é o tempo em meses.

Os resultados são mostrados nos itens 7.5.1.1 e 7.5.2.1.

## 6 MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.1 Seleção do material

Conforme mencionado anteriormente, o objetivo do trabalho consiste em preparar um material certificado em mercúrio (Hg) e metilmercúrio (MeHg), visando sanar uma deficiência no país quanto à disponibilidade de materiais de referência na área de alimentos colaborando com empresas exportadoras de pescado e órgãos governamentais. Dessa forma, a espécie considerada como matéria prima para o trabalho está diretamente ligada ao mercado exportador, atendendo a normas internacionais, que cada vez mais, estão exigentes quanto ao cumprimento de legislações que determinam os limites permissíveis de elementos químicos tóxicos. Dessa forma, tendo como base o relatório<sup>68</sup> Estatística da Pesca – 2004 – Brasil Grandes Regiões e Unidades da Federação, emitido em dezembro de 2005, os principais produtos exportados nessa área são os da espécie Dourada, Pargo, Pescadas e Piramutaba. Assim, escolheu-se a espécie Dourada (*Brachyplatystoma flavicans*) para a preparação. Essa espécie, além de pertencer ao grupo dos peixes carnívoros, está situada no topo da cadeia trófica, apresentando valor médio de concentração igual a  $252,0 \pm 79,9 \text{ ng g}^{-1}$  de mercúrio em seu tecido<sup>69</sup>.

Definida a família e a espécie foi contatado o ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA e depois empresas exportadoras e/ou pesqueiras que pudessem fornecer a matéria prima. Finalmente, a empresa Ecomar<sup>70</sup>, sediada na cidade de Vigia, próxima a Belém no estado do Pará, forneceu aproximadamente vinte quilos para a preparação do material.

Esta matéria prima foi devidamente identificada e enviada para o laboratório com todos os procedimentos de embalagem e congelamento corretamente executados.

## 6.2. Processamento

### 6.2.1 Recebimento e preparação do material

O material recebido consistiu de nove indivíduos de peixe da espécie Dourada, com quantidade igual a 18,2 kg. O material foi armazenado em freezer (capacidade de 270 litros, Frostfree, Brastemp) a uma temperatura igual a  $18^{\circ}\text{C}$  negativos. O comprimento dos indivíduos variou na faixa de  $53 \pm 3$  cm e o peso na faixa de  $1967 \pm 450$  g.

A seqüência das atividades realizadas com os indivíduos (unidades individuais) do peixe, até a etapa de liofilização, está mostrada na FIG. 7.

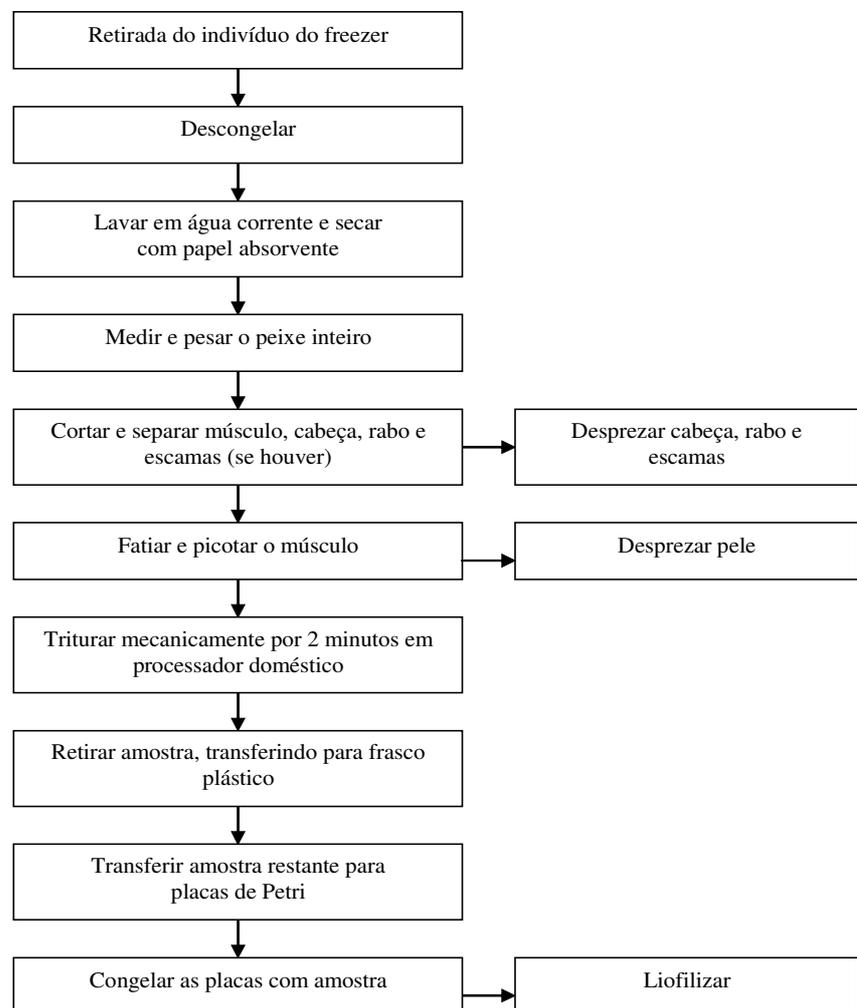


FIGURA 7 – Seqüência das atividades realizadas com indivíduos até liofilização

Todo o material utilizado na preparação, tais como facas, bandejas plásticas, tábuas para corte, recipiente do triturador, frascos plásticos e placas de Petri, foram previamente limpos e descontaminados, sendo a última lavagem realizada com água Milli-Q (Academic, 18,2 M $\Omega$ -cm, Millipore Corporation).

Constatou-se que a quantidade obtida do material até a etapa do início da liofilização corresponde a aproximadamente 38% da massa inicial, ou seja, 62% do material é descartado na forma de cabeça, rabo, vísceras e outras partes não utilizáveis.

Para o processo de liofilização foi utilizado um liofilizador marca Leipzig, modelo MLW-LG05. As amostras, acondicionadas em placas de Petri (diâmetro aproximado de 10 cm), foram liofilizadas em lotes de 16 placas (capacidade máxima do equipamento) por 24 horas. Cada placa continha cerca de 50 g de material, totalizando, portanto cerca de 800 g de material a ser liofilizado por lote. Após o término do processo de liofilização, as placas foram armazenadas em dessecador. A porcentagem de umidade foi calculada pesando-se inicialmente as placas antes e após o processo de liofilização sendo que, o valor médio obtido para esta espécie foi de  $80 \pm 2\%$ .

Após o processo de liofilização, o material foi triturado até obtenção de um pó fino e homogêneo. O método utilizado foi manual, consistindo inicialmente de quebra das partículas maiores com um martelo apropriado e em seguida transferência do material para um almofariz e trituração com pistilo por aproximadamente 5 a 10 minutos. O material obtido é de coloração amarela clara, sendo um pó fino com agregados maiores e restos pequenos de pele. Em seguida, porções foram transferidas para uma peneira plástica, tipo doméstica, e o material foi peneirado. Com o propósito de caracterizar o material quanto a granulometria, uma porção do mesmo foi transferida para um equipamento denominado de agitador eletro-magnético (agitador de peneiras) para análise granulométrica (modelo máquina 1675, 110/220V, Bertel), sendo os resultados mostrados no item 7.2.1, obtendo-se um pó com granulometria na faixa de 90 – 150  $\mu\text{m}$ .

Após o término do processo de trituração, o material foi homogeneizado em equipamento apropriado (homogeneizador modelo TE200, forma “V”, Tecnal) pertencente ao Instituto Tecnológico de Alimentos – ITAL, localizado em Campinas, Estado de São Paulo.

Com o objetivo de eliminação de microorganismos e prevenir sua reprodução, a próxima etapa foi a esterilização do material por irradiação no Centro de Tecnologia das Radiações – CTR, do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – Ipen. A amostra,

consistindo de aproximadamente 1,2 kg de material, acondicionada em frasco de vidro, foi irradiada com uma atividade de 4,9 KGy. Este valor de atividade foi utilizado baseado em informação proveniente da Comissão Chilena de Energia Nuclear<sup>71</sup> e trabalho de pesquisa realizado no Ipen<sup>31</sup>.

Em seguida, o material foi acondicionado em frascos tipo âmbar com capacidade de 100 mL. O envase do material ocorreu em uma área controlada, contendo um sistema de filtragem de ar central, ante-sala para troca de roupa adequada e sistema de ar condicionado, capela de fluxo laminar, tomando-se o cuidado em manter a exaustão desligada devido à condição de pó fino. Foram preparados 80 frascos com uma massa igual a 15 g por unidade, através de pesagem em balança eletrônica calibrada (BG 2000, capacidade total de 2000 g, Gehaka Ind. E Com.).

### **6.3 Certificação do material**

A certificação do material foi realizada por meio de duas técnicas analíticas. Para os estudos de homogeneidade e estabilidade, nos quais a determinação de Hg total e MeHg foram executadas, utilizou-se a espectrofotometria de absorção atômica com geração de vapor frio e injeção em fluxo (FIA-CV-AAS) e para obtenção dos valores das propriedades (analitos) utilizou-se a técnica de diluição isotópica aplicada à espectrometria de massas (IDMS).

#### **6.3.1 Estudo de homogeneidade**

Conforme descrito na norma ISO Guia 35, para o estudo de homogeneidade selecionou-se um subconjunto do lote produzido através de um planejamento de amostragem. Dessa forma, 10 frascos foram selecionados aleatoriamente nos quais foram realizadas determinações de mercúrio total (Hg total) e metilmercúrio (MeHg). Para Hg total, de cada frasco foram retiradas três porções de 0,4 g cada, digeridas e diluídas conforme procedimento descrito no item 6.3.3.1, e cada alíquota foi medida em triplicata, obtendo-se, portanto nove (9) resultados para cada frasco. Para MeHg, inicialmente, de cada frasco, foram retiradas também três porções de 0,4 g cada e preparadas conforme procedimento descrito no item 6.3.3.2, e cada alíquota foi medida em triplicata, obtendo-se, portanto nove (9) resultados para cada frasco. Posteriormente, mais duas porções de 0,4 g cada (A e B) foram retiradas de cada frasco para determinação de MeHg. Cada alíquota foi medida em triplicata, obtendo-se, portanto seis (6) resultados para cada frasco. Em seguida, foi obtido o valor médio de cada alíquota. Este procedimento diferenciado para

MeHg foi necessário devido ao processo de avaliação dos resultados de homogeneidade descrito posteriormente.

Os 10 frascos foram analisados para cada um dos analitos e valores discrepantes (outliers) foram testados, por dois métodos distintos: o teste de Grubbs e o teste de Dixon. A descrição dos testes de Grubbs e de Dixon<sup>4,72,73</sup> é apresentada no ANEXO A.

Conforme mencionado anteriormente (item 4.4.1) a avaliação dos resultados no estudo de homogeneidade foi realizada, para mercúrio total, por análise de variância (ANOVA) e para metilmercúrio, pelo teste chamado de “homogeneidade suficiente”. Essa alternativa para avaliar a homogeneidade desse analito foi utilizada porque o método de medição disponível não se mostrou suficientemente repetitivo apresentando uma conclusão não satisfatória quando da avaliação de dados realizada por ANOVA.

Os resultados estão descritos nos itens 7.3.1 e 7.3.2.

### **6.3.2 Estudo de estabilidade**

A estabilidade do material foi determinada através da metodologia descrita e exemplificada na norma ISO Guia 35.

Primeiramente, foram selecionados os frascos de códigos 9, 26, 31, 50 e 63 sendo que a massa de cada um destes frascos foram subdivididas em outros frascos para o estudo na temperatura de 20 °C. Foram também selecionados os frascos de códigos 2, 14, 36, 55 e 78 para o estudo na temperatura de 40 °C. Os tempos estudados consistiram de 0, 35, 70, 150 e 365 dias.

A cada tempo decorrido, um lote de cinco frascos era retirado da estufa e os demais deixados para transcorrer o tempo faltante.

Um estudo de estabilidade em temperatura aproximada de 8 °C (temperatura de geladeira) foi realizado com os seguintes frascos de códigos 7, 27, 41, 57 e 68. Os tempos estudados consistiram de 0, 90 e 180 dias.

O estudo de estabilidade foi realizado para os analitos Hg total e MeHg, conforme procedimentos descritos nos itens 6.3.3.1 e 6.3.3.2, para todos os frascos selecionados. Valores discrepantes (outliers) foram testados, por dois métodos distintos: o teste de Grubbs e o teste de Dixon, antes da avaliação dos resultados.

A temperatura de referência para o estudo foi a temperatura ambiente.

Os resultados obtidos estão descritos no item 7.5.

### **6.3.3 Descrição dos procedimentos analíticos utilizados para determinação de Hg total e MeHg**

#### **6.3.3.1 Determinação de mercúrio total (Hg total) por FIA-CV-AAS**

A amostra (0,4 g) é pesada em papel manteiga, transferida junto com o papel para balão de vidro e digerida com mistura ácida contendo 2 mL de ácido sulfúrico concentrado, 1 mL de ácido nítrico concentrado, 1 mL de ácido perclórico concentrado e 1 mL de água desmineralizada. Todos os ácidos utilizados são específicos para determinação de mercúrio (Merck & Co, NY). A mistura é aquecida a 100 °C durante 30 minutos e depois de resfriada é diluída a 20 g com água desmineralizada e transferida para frasco plástico com tampa. A solução final é inserida no sistema de introdução de amostra do espectrofotômetro de absorção atômica (SpectrAA220-FS, Varian Austrália Pty Ltd.), e o mercúrio é determinado por meio da técnica de espectrofotometria de absorção atômica com geração de vapor frio e injeção em fluxo (FIA-CV-AAS), utilizando cloreto estanoso como agente redutor. O controle das análises realizadas foi realizado pela análise de material de referência designado como Dorm-2, proveniente do NRCC – Canadá, certificado para Hg total.

#### **6.3.3.2 Determinação de metilmercúrio (MeHg) por FIA-CV-AAS**

O método é baseado na lixiviação ácida com solução de ácido clorídrico 6 mol L<sup>-1</sup> e separação do mercúrio orgânico e inorgânico em uma coluna de troca iônica, seguido de determinação por meio da técnica de espectrofotometria de absorção atômica com geração de vapor frio e injeção em fluxo (FIA-CV-AAS). A solução de HCl 6 mol L<sup>-1</sup> extrai quantitativamente o MeHg dos tecidos biológicos e uma coluna de troca iônica foi usada para separar o composto MeHgCl não iônico (que passa através da resina de troca iônica) do complexo HgCl<sub>4</sub><sup>2-</sup>, que fica retido na resina. Na FIG. 8 é mostrada a técnica de separação de troca iônica realizada nas amostras. Uma vez separado, o MeHg tem que ser decomposto para Hg<sup>2+</sup>, porque o reagente cloreto de estanho II (oso) – SnCl<sub>2</sub>, utilizado como redutor no processo de geração de vapor frio, pode reduzir somente o Hg iônico inorgânico. A decomposição pode ser feita por radiação ultravioleta (UV) ou decomposição ácida. No presente trabalho utilizou-se a decomposição por radiação ultravioleta (UV).

Para a determinação de MeHg, cerca de 0,4 g de material foi pesado em tubo tipo Falcon, material plástico, com capacidade de 15 mL. Após a pesagem, foram

adicionados 10 mL de solução de HCl 6 mol L<sup>-1</sup> e agitou-se manualmente por alguns minutos, em seguida, colocou-se uma proteção para impedir a incidência de luz nos tubos e as amostras foram transferidas para mesa agitadora (tipo Shaker, Q-225.21, Quimis Ltda.) por 3 horas e em seguida, as amostras foram deixadas em repouso por aproximadamente 12 horas. Depois, as mesmas, foram centrifugadas (Excelsa® II, 206-BL, FANEM) por 10 minutos a uma velocidade de 3000 rpm e o sobrenadante foi percolado através de coluna de quartzo contendo 1,5 cm de resina de troca iônica, tipo aniônica, Dowex 1x8 100-200 Mesh, forma cloreto (Cl<sup>-</sup>). A amostra restante no tubo foi lavada com mais 8 mL de solução de HCl 6 mol L<sup>-1</sup> e centrifugada por mais dois minutos a uma velocidade de 3000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi percolado através da mesma coluna com resina aniônica, totalizando, portanto 18 mL de solução eluída. O material eluído da coluna foi recolhido em tubo de quartzo, adicionado 1 mL de solução de cloreto de bromo (BrCl) com agitação manual e deixado, por 12 horas, sob lâmpada ultravioleta, com a finalidade de decompor o MeHg. Em seguida, a solução foi diluída até uma massa final igual a 30 g com água desmineralizada e transferida para frasco plástico com tampa. Finalmente, procedeu-se a determinação de Hg por meio da técnica de espectrofotometria de absorção atômica com geração de vapor frio (FIA-CV-AAS). Esta determinação indica a quantidade de Hg orgânico presente na amostra, uma vez que, apenas o Hg orgânico passou pela resina como explicado anteriormente. O controle das análises realizadas foi realizado pela análise de material de referência designado como Dorm-2, proveniente do NRCC – Canadá, certificado também para MeHg.



FIGURA 8 – Técnica de separação de troca iônica, para mercúrio inorgânico e orgânico, realizada nas amostras

#### **6.4 Caracterização através da técnica de diluição isotópica aplicada à espectrometria de massas**

Conforme citado em 4.4.3, existem quatro abordagens básicas para a caracterização do candidato a MRC. Neste trabalho, a caracterização do material foi realizada através da aplicação de um método primário, tendo alta exatidão e para o qual o limite de incerteza pode ser informado com alto grau de confiança. Este método foi a técnica de diluição isotópica aplicada à espectrometria de massas (IDMS). O método foi utilizado na caracterização de mercúrio, metilmercúrio e chumbo.

Para garantir a aplicabilidade da técnica e validade nos resultados obtidos, porções de dois diferentes materiais de referência certificados, designados como Dorm-2 (Dogfish Muscle, NRCC, Canadá) e Dolt-2 (Dogfish Liver Certified Reference Materials for Trace Metals, NRCC, Canadá), foram preparadas e analisadas juntamente com as amostras do material candidato.

Todos os frascos utilizados para acondicionamento das soluções foram previamente lavados e descontaminados com solução de ácido nítrico a 20% (v/v), seguindo recomendações de Lee e Suh<sup>74</sup>.

Para a preparação de todas as soluções necessárias e pesagens das misturas (amostra + traçador) utilizou-se uma balança calibrada marca Mettler, modelo H54AR, com cinco casas decimais.

#### **6.4.1 Calibração do traçador isotópico de mercúrio e preparação das misturas padrão + traçador**

Um método bastante preciso para determinar a concentração do elemento de interesse no traçador é a aplicação da própria técnica de diluição isotópica, normalmente denominada como diluição isotópica reversa. Na FIG. 9 é apresentado o esquema geral adotado para a preparação e calibração dos traçadores isotópicos. As calibrações das soluções de traçadores envolveram análises isotópicas de três soluções: solução do traçador, solução do padrão e solução mistura (solução padrão + solução traçador).

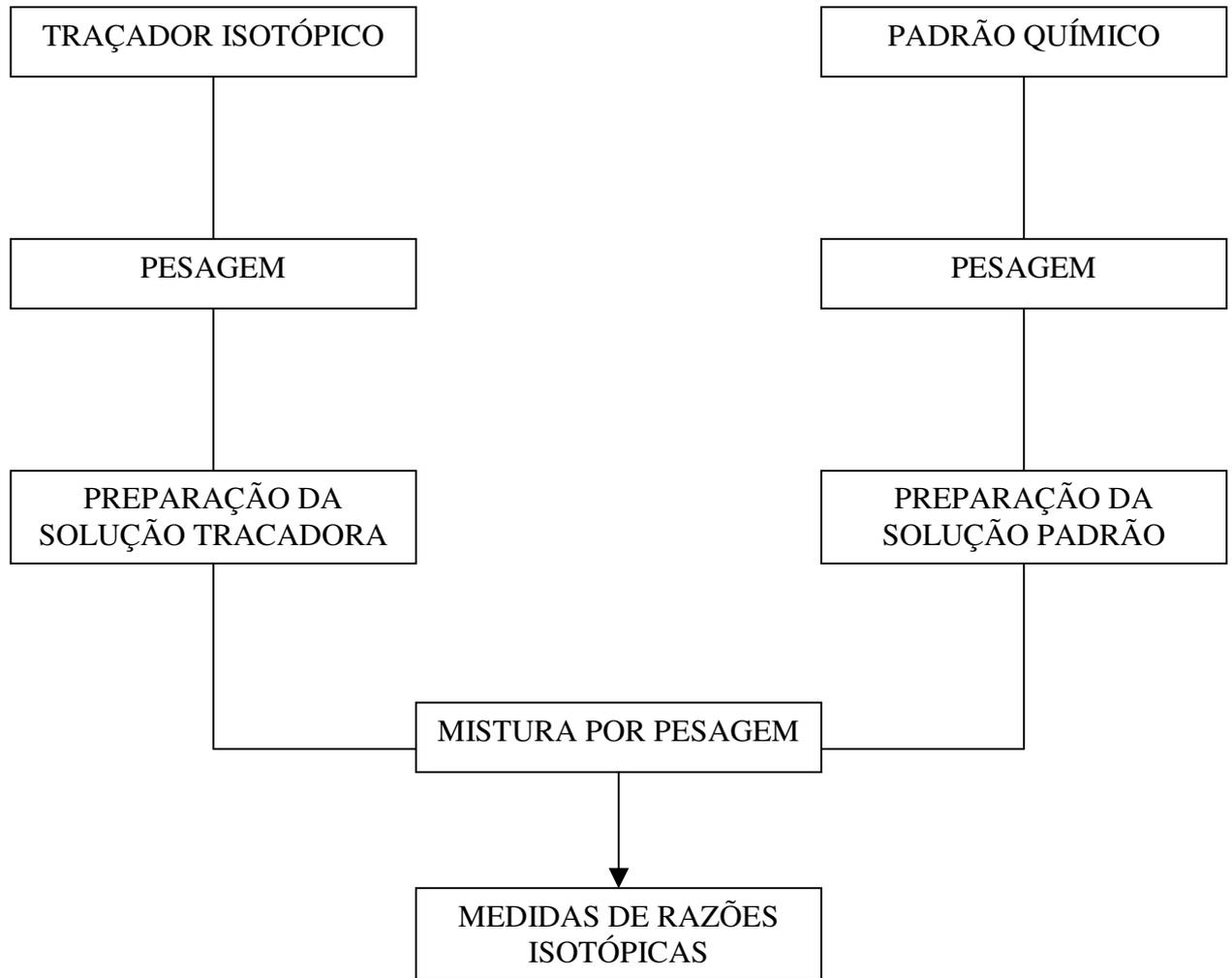


FIGURA 9 – Diagrama geral para a preparação e calibração do traçador isotópico

O traçador de mercúrio utilizado (IRMM 640, Retieseweg, B-2440, GELL, Belgium) tem composição isotópica, fornecida no respectivo certificado, apresentada na TAB. 2. A solução de traçador preparada foi calibrada com padrão de mercúrio (IRMM 639, Retieseweg, B-2440, GELL, Belgium) que tem composição isotópica, fornecida no respectivo certificado, apresentada na TAB. 3.

TABELA 2 – Composição isotópica do traçador de mercúrio IRMM 640

Isótopo de mercúrio	Valor certificado $\pm$ incerteza* (%)
<sup>196</sup> Hg	0,001767 $\pm$ 0,000037
<sup>198</sup> Hg	0,0608 $\pm$ 0,0011
<sup>199</sup> Hg	0,1566 $\pm$ 0,0016
<sup>200</sup> Hg	0,5371 $\pm$ 0,0033
<sup>201</sup> Hg	1,3042 $\pm$ 0,0050
<sup>202</sup> Hg	97,6859 $\pm$ 0,0068
<sup>204</sup> Hg	0,2535 $\pm$ 0,0020

\* Incerteza expandida (U) com  $k = 2$ , correspondendo a um nível de confiança igual a 95%, como definido no Guia de Expressão da incerteza de medição (GUM).

TABELA 3 – Composição isotópica do padrão de mercúrio (IRMM 639) utilizado para calibração do traçador

Isótopo de mercúrio	Valor certificado $\pm$ incerteza* (%)
<sup>196</sup> Hg	0,1489 $\pm$ 0,0013
<sup>198</sup> Hg	9,900 $\pm$ 0,052
<sup>199</sup> Hg	16,826 $\pm$ 0,064
<sup>200</sup> Hg	23,073 $\pm$ 0,058
<sup>201</sup> Hg	13,213 $\pm$ 0,025
<sup>202</sup> Hg	29,944 $\pm$ 0,053
<sup>204</sup> Hg	6,895 $\pm$ 0,030

\* Incerteza expandida (U) com  $k = 2$ , correspondendo a um nível de confiança igual a 95%, como definido no Guia de Expressão da incerteza de medição (GUM).

Para a calibração do traçador isotópico, as soluções do padrão, traçador e mistura (padrão + traçador) são preparadas da seguinte maneira:

- a) Solução traçador de mercúrio: pesou-se uma massa igual a 1,23048 g, da solução original do traçador IRMM 640, e adicionou-se solução de HNO<sub>3</sub> 2% (v/v) até uma massa final igual a 29,98907 g, obtendo-se uma solução final com concentração de aproximadamente 0,125  $\mu$ g de mercúrio por grama de solução.
- b) Solução padrão de calibração: Uma massa igual a 0,53010 g foi pesada, da solução original do padrão IRMM 639, e adicionou-se solução de HNO<sub>3</sub> 2% (v/v) até uma massa final igual a 29,98851 g, obtendo-se uma solução final com concentração de 0,140  $\mu$ g de mercúrio por grama de solução.

- c) Solução mistura: as misturas de padrão de calibração e traçador isotópico foram preparadas em triplicata, de acordo com o diagrama mostrado na FIG. 10. As alíquotas das soluções de padrão e traçador foram pesadas diretamente em tubo plástico, tipo falcon, e armazenadas em geladeira até o momento da análise.

#### 6.4.2 Calibração do traçador isotópico de chumbo e preparação das misturas padrão + traçador

O traçador de chumbo utilizado ( $^{207}\text{Pb}$ , ORNL-Oak Ridge, TN, USA) tem composição isotópica, fornecida no respectivo certificado, apresentada na TAB. 4. A solução de traçador preparada foi calibrada com padrão de chumbo (NIST SRM 981) que tem composição isotópica, fornecida no respectivo certificado, apresentada na TAB. 5.

TABELA 4 – Composição isotópica do traçador de chumbo ( $^{207}\text{Pb}$ , ORNL)

Isótopo de chumbo	Valor certificado $\pm$ precisão (%) <sup>(*)</sup>
$^{204}\text{Pb}$	< 0,02
$^{206}\text{Pb}$	2,16 $\pm$ 0,05
$^{207}\text{Pb}$	92,4 $\pm$ 0,1
$^{208}\text{Pb}$	5,48 $\pm$ 0,05

(\*) Dados de precisão informados no certificado.

TABELA 5 – Composição isotópica do padrão de chumbo (NIST SRM 981) utilizado para calibração do traçador

Isótopo de chumbo	Valor certificado $\pm$ Erro* (%)
$^{204}\text{Pb}$	1,4255 $\pm$ 0,0012
$^{206}\text{Pb}$	24,1442 $\pm$ 0,0057
$^{207}\text{Pb}$	22,0833 $\pm$ 0,0027
$^{208}\text{Pb}$	52,3470 $\pm$ 0,0086

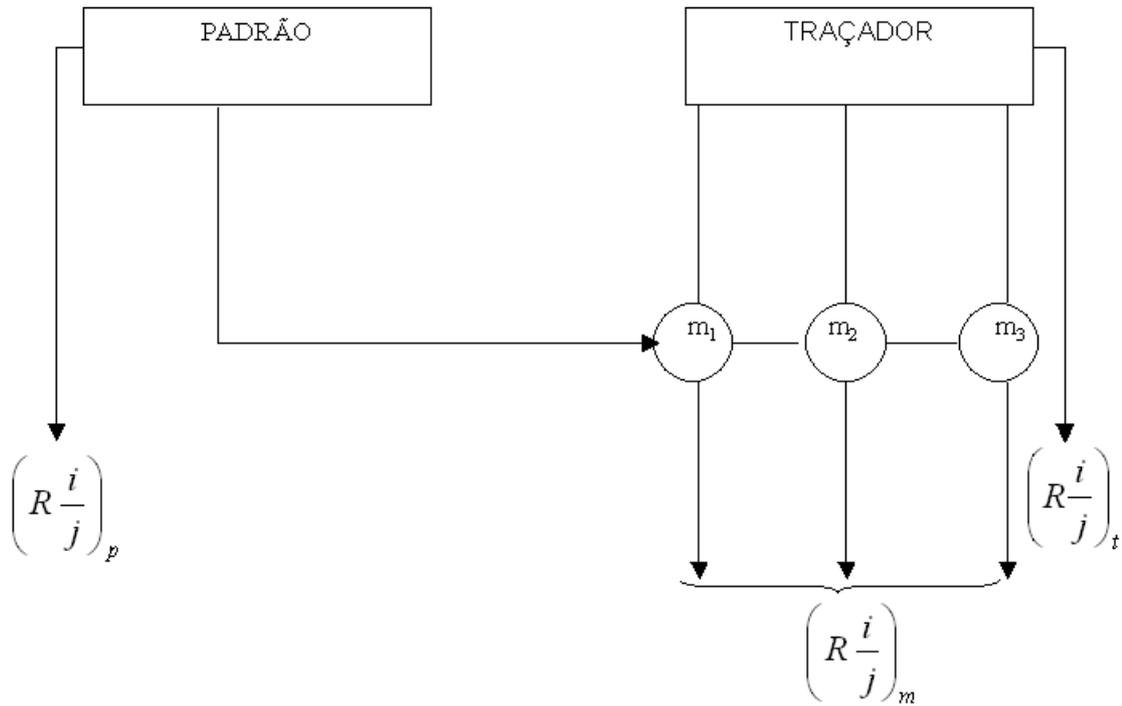
\* Limites globais de erro baseados em nível de confiança igual a 95% (Texto do certificado)

Para a calibração do traçador isotópico, as soluções do padrão, traçador e mistura (padrão + traçador) são preparadas da seguinte maneira:

- a) Solução traçador: foi preparada pela dissolução de uma quantidade exatamente conhecida e pesada de  $^{207}\text{Pb}$  igual a 0,02172 g e diluída até uma massa final de 99,99203 g com solução de  $\text{HNO}_3$  2% (v/v). Dessa solução, retirou-se uma alíquota que foi pesada, diluída a 100 g com solução de  $\text{HNO}_3$  2% (v/v), obtendo-se uma concentração final de aproximadamente  $0,55 \mu\text{g g}^{-1}$ . Finalmente, uma terceira diluição foi preparada, pesando-se uma alíquota da solução anterior e diluindo a

aproximadamente 50 g com solução de HNO<sub>3</sub> 2% (v/v), obtendo-se uma solução final com concentração de aproximadamente 0,040 µg de chumbo por grama de solução.

- b) Solução padrão de calibração: foi preparada pela dissolução de uma quantidade exatamente conhecida e pesada de SRM 981 igual a 0,02086 g e diluída até uma massa final de 100,06803 g com solução de HNO<sub>3</sub> 2% (v/v). Dessa solução, retirou-se uma alíquota que foi pesada, diluída a 100 g com solução de HNO<sub>3</sub> 2% (v/v), obtendo-se uma concentração final de aproximadamente 0,31 µg g<sup>-1</sup>. Finalmente, uma terceira diluição foi preparada, pesando-se uma alíquota da solução anterior e diluindo a aproximadamente 50 g com solução de HNO<sub>3</sub> 2% obtendo-se uma solução final com concentração de aproximadamente 0,040 µg de chumbo por grama de solução.
- c) Solução mistura: as misturas de padrão de calibração e traçador isotópico foram preparadas em triplicata, de acordo com o diagrama mostrado na FIG. 10. As alíquotas das soluções de padrão e traçador foram pesadas diretamente em tubo plástico, tipo falcon, e armazenadas em geladeira até o momento da análise.



$R \frac{i}{j}$  = razão entre os isótopos “i” e “j” para um determinado elemento. Índices p = padrão; t = traçador; m = mistura.

FIGURA 10 – Esquema do procedimento adotado para a calibração dos traçadores isotópicos

#### 6.4.3 Preparação das amostras do material candidato a material de referência certificado com adição dos traçadores

Para determinar a massa de amostra e a massa de traçador a serem pesadas, além da concentração das soluções dos traçadores utilizados, para compor a mistura que foi analisada com o objetivo de caracterizar os analitos, foi necessário inicialmente determinar a concentração de cada analito presente na amostra. Para mercúrio, o valor médio obtido no estudo de homogeneidade do material, por meio da técnica FIA-CV-AAS, foi considerado como o valor preliminar. Para chumbo, uma análise foi realizada, por meio da técnica de espectrometria de massas com fonte de plasma induzido, no equipamento HRICP-MS (Element 2, Finnigan-MAT, Alemanha), o mesmo utilizado para determinação das razões isotópicas. Em seguida, utilizando-se da equação 11 de cálculo para diluição isotópica, explicada no item 4.7.2, obtiveram-se as massas necessárias e concentrações dos traçadores. No APÊNDICE B é mostrado o cálculo realizado, em planilha Excel, para o analito mercúrio.

Dessa forma, sendo a massa de amostra fixada em 0,4 g pesou-se 0,2 g da solução de traçador de mercúrio com concentração igual a  $0,013 \mu\text{g g}^{-1}$  e 1,06 g da solução de traçador de chumbo com concentração igual a  $0,00101 \mu\text{g g}^{-1}$ , diretamente em um recipiente de teflon mostrado na FIG. 11. Em seguida, foi adicionado 2 mL de ácido nítrico concentrado destilado e agitado manualmente. O recipiente foi fechado com tampa de teflon e uma camada de fita teflon foi colocada na junção entre o recipiente e a tampa. O conjunto (recipiente e tampa) foi transferido para uma chapa aquecedora e procedeu-se a digestão por 100 minutos a uma temperatura de  $100^\circ\text{C}$ . Finalmente, após o resfriamento, a amostra digerida foi transferida para tubo plástico, tipo Falcon, com capacidade de 15 mL e foi diluída até uma massa final igual a 10 g. Em seguida, as determinações das razões isotópicas na mistura foram realizadas no HRICP-MS. Para o analito mercúrio a razão  $^{200}\text{Hg}/^{202}\text{Hg}$  foi medida e para o analito chumbo a razão medida foi  $^{206}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$ . Foram preparadas seis replicatas da amostra. O recipiente de teflon utilizado foi previamente lavado com água desmineralizada, solução de ácido nítrico a 20% (v/v) e água Milli-Q (Academic,  $18,2 \text{ M}\Omega\text{-cm}$ , Millipore Corporation).

Para a determinação de metilmercúrio, a metodologia descrita no item 6.3.3.2 foi utilizada para preparação das amostras. Foi realizado um teste preliminar preparando a amostra e adicionando o traçador de Hg IRMM 640, utilizado para determinação de Hg total, uma vez que a solução de traçador de metilmercúrio não estava disponível para a realização desta etapa do trabalho. O resultado do teste realizado foi plenamente satisfatório, pois o valor esperado da concentração do analito foi obtido. O procedimento foi confirmado com análises de alíquotas de materiais de referência certificados (Dorm-2 - Dogfish Muscle, NRCC, Canadá e Dolt-2 – Dogfish Liver Certified Reference Materials for Trace Metals, NRCC, Canadá). Dessa forma, foram preparadas seis replicatas da amostra, sendo que, após a etapa de 12 horas sob lâmpada ultravioleta (como descrito em 6.3.3.2) a amostra não foi diluída e foi adicionada uma massa igual a 0,2 g da solução do traçador de Hg IRMM 640 com concentração igual a  $0,013 \mu\text{g g}^{-1}$  e determinadas as razões isotópicas  $^{200}\text{Hg}/^{202}\text{Hg}$ .



FIGURA 11 – Recipiente de teflon<sup>®</sup> utilizado na preparação de amostras para a técnica IDMS

### 6.5 Procedimentos analíticos utilizados para determinação de chumbo (Pb), arsênio (As) e cádmio (Cd)

Conforme citado em 6.4, o analito chumbo foi determinado através da técnica de diluição isotópica aplicada à espectrometria de massas (IDMS). O analito arsênio foi determinado por meio da técnica de Análise por Ativação Neutrônica Instrumental (INAA) e cádmio foi determinado por meio da técnica de espectrometria de massas de alta resolução com fonte de plasma induzido (HRICP-MS).

Os resultados para esses analitos estão descritos no item 7.10.

## **7 RESULTADOS OBTIDOS E DISCUSSÃO**

Este trabalho foi desenvolvido dentro de um programa de qualidade institucional implantado desde 1995. No escopo desse programa, e com o apoio do Programa Brasileiro de Metrologia em Química (PBMQ), o Laboratório de Caracterização Química (LCQ) obteve em 2007, a acreditação (INMETRO) segundo os requisitos estabelecidos na norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005, para o ensaio de determinação de mercúrio total em tecido de peixe por meio da técnica de espectrofotometria de absorção atômica com geração de vapor frio e injeção em fluxo (FIA-CV-AAS). No ANEXO B é apresentado o certificado de acreditação.

### **7.1 Controle de qualidade**

Todo o processo de medição das amostras por meio da técnica FIA-CV-AAS, foi monitorado com análise do material de referência certificado Dorm-2 (Dogfish Muscle, NRCC, Canadá), certificado em mercúrio total e metilmercúrio. Para a determinação de Hg total a recuperação obtida para o Dorm foi de 99 a 100% e para MeHg a recuperação foi de 70 a 90%. Nos APÊNDICES C e D são apresentados os gráficos de controle, para o material Dorm, dos resultados obtidos das determinações de Hg total e MeHg. Observa-se que todos os resultados obtidos estão localizados entre os limites inferior e superior, calculados com o valor da incerteza associada ao processo de medição, comprovando que todo o processo está sob controle.

De modo a avaliar-se a robustez do procedimento foram analisados outros dois materiais de referências certificados (BCR 463 e Dolt-2) contendo valores de concentração de Hg e MeHg diferentes. Na TAB. 6 são mostrados os resultados obtidos para os materiais analisados.

TABELA 6 – Resultados obtidos da determinação de mercúrio total e metilmercúrio, por meio da técnica FIA-CV-AAS, para outros materiais de referência certificados

	Hg total		MeHg	
	Certificado ( $\mu\text{g g}^{-1} \pm$ incerteza*)	Obtido ( $\mu\text{g g}^{-1} \pm$ incerteza*)	Certificado ( $\mu\text{g g}^{-1} \pm$ incerteza*)	Obtido ( $\mu\text{g g}^{-1} \pm$ incerteza*)
BCR 463	2,85 $\pm$ 0,16	3,07 $\pm$ 0,37	3,04 $\pm$ 0,16	3,06 $\pm$ 0,46
Dolt 2	1,99 $\pm$ 0,10	2,08 $\pm$ 0,25	0,693 $\pm$ 0,053	0,697 $\pm$ 0,104

\*Incerteza expandida (U) com  $k = 2$ , para a um nível de confiança igual a 95%. Nos resultados obtidos no laboratório por meio da técnica FIA-CV-AAS, para Hg total, a incerteza expandida corresponde a 12% e para MeHg corresponde a 15%.

A avaliação dos resultados obtidos foi realizada com o emprego do erro normalizado, geralmente utilizado em comparação de medições<sup>75,76</sup>, e calculado conforme equação 31. Os resultados para a determinação de Hg total foram iguais a 0,55 e 0,33, nas amostras de BCR 463 e Dolt 2, respectivamente. Nas determinações de MeHg, os resultados obtidos foram iguais a 0,04 e 0,03, nas amostras de BCR 463 e Dolt 2, respectivamente. O critério para aceitação deste parâmetro de desempenho é se  $|E_n| \leq 1$  o desempenho é considerado satisfatório. Dessa forma, todos os resultados são satisfatórios.

$$E_n = \frac{x_{lab} - X}{\sqrt{U_{lab}^2 - U_{ref}^2}} \quad (31)$$

onde:  $x_{lab}$  é o resultado obtido no laboratório;  $X$  é o valor referência;  $U_{lab}^2$  é a incerteza obtida no laboratório e  $U_{ref}^2$  é a incerteza do valor referência.

As metodologias utilizadas nas determinações de Hg total e MeHg estão descritas nos itens 6.3.3.1 e 6.3.3.2.

## 7.2 Ensaios complementares

### 7.2.1 Análise granulométrica

Uma porção do material foi transferida para o equipamento designado como agitador de peneiras com o objetivo de análise granulométrica, obtendo-se os resultados mostrados na TAB. 7.

TABELA 7 – Resultado obtido na análise granulométrica do material

Massa inicial = 6,102 g

Abertura na peneira (microm) ( $\mu\text{m}$ )	Massa retida em cada peneira (g)	Porcentagem de massa retida (%)
150	3,580	58,7
106	0,677	11,1
90	0,312	5,1
75	0,290	4,8
63	0,538	8,8
< 63	0,399	6,5
total	5,796	95,0

Verifica-se que na faixa de abertura na peneira de 90 – 150  $\mu\text{m}$  tem-se aproximadamente 75% do material. O restante (20%) situa-se na faixa de abertura na peneira de < 63 – 75  $\mu\text{m}$ .

### 7.2.2 Umidade relativa

A determinação de umidade relativa do material foi realizada conforme procedimento modificado da descrição existente no certificado do MRC Dorm-2 (Dogfish Muscle, NRCC, Canadá). Resumidamente consistiu de pesagem de 3 gramas da amostra do material, mantida em dessecador contendo sílica, durante 24 horas. Foi realizada a primeira pesagem e repetição da operação até peso constante.

Resultado obtido:

$$\frac{100 \times 0,271}{3,004} = 9,0\%$$

onde: 0,271 é perda de massa (em gramas) durante a operação e 3,004 é a massa inicial da amostra.

## 7.3 Estudo de homogeneidade

### 7.3.1 Homogeneidade para mercúrio total (Hg total)

A análise dos dados pelos testes de Grubbs e de Dixon não indicou a presença de outliers. A descrição dos testes de Grubbs e de Dixon<sup>4,72,73</sup> é apresentada no ANEXO A. Os resultados da avaliação dos dados para o estudo de homogeneidade para este analito são mostrados nas TAB. 8 e 9.

TABELA 8 – Resultados obtidos dos valores médios, desvio padrão e variância dos resultados das replicatas analisadas para Hg total

FRASCO N.	Desvio Padrão			N. Medidas (n <sub>i</sub> )
	Média (µg g <sup>-1</sup> )	(µg g <sup>-1</sup> )	Variância	
2	0,306	0,013	0,000160	9
9	0,280	0,023	0,000545	9
14	0,303	0,081	0,006557	9
26	0,272	0,023	0,000531	9
31	0,269	0,027	0,000737	9
36	0,303	0,011	0,000116	9
50	0,307	0,013	0,000166	9
55	0,301	0,007	0,000047	9
63	0,308	0,013	0,000176	9
78	0,305	0,012	0,000136	9

TABELA 9 – Resultados obtidos da análise de variância (ANOVA) dos resultados de Hg total

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0,01919	9	0,002132	2,325	0,022181	2,637
Dentro dos grupos	0,07337	80	0,000917			
Total	0,09256	89				

Como  $F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$  ( $2,325 < 2,637$ ) a homogeneidade é comprovada.

A estimativa da incerteza para homogeneidade foi calculada através da equação 2 anteriormente explicada no item 4.4.1.

$$u_{bb} = \sqrt{\frac{MQ_{dentro}}{n}} \times \sqrt[4]{\frac{2}{df_{dentro}}}$$

Onde:  $MQ_{dentro}$  é obtida através dos dados da análise de variância (ANOVA) e  $df_{dentro}$  é o número de graus de liberdade para  $MQ_{dentro}$ . Assim,

$$u_{bb} = \sqrt{\frac{0,000917}{20}} \times \sqrt[4]{\frac{2}{80}} = 0,006771 \times 0,3976 = 0,002692 \mu\text{g g}^{-1}$$

### 7.3.2 Homogeneidade para metilmercúrio (MeHg)

A análise dos dados pelo testes de Grubbs e de Dixon não indicou a presença de outliers. O resultado da avaliação dos dados para o estudo de homogeneidade para este analito é mostrado na TAB. 10.

Nas segunda e terceira colunas da tabela encontram-se os resultados obtidos nas duplicatas dos 10 frascos testados, nas demais colunas da TAB. 10 são apresentados os valores das diferenças entre duplicatas (D), as somas das duplicatas (S) e os quadrados das diferenças entre as duplicatas ( $D^2$ ).

Nos itens apresentados após a tabela, são mostradas as equações utilizadas para os cálculos do teste de homogeneidade. No item (a), a variância analítica ( $s^2_{an}$ ) é obtida dividindo-se o somatório dos quadrados das diferenças entre os resultados de duplicatas ( $D^2$ ) por  $2*m$ , sendo  $m$  o número de frascos. Em (b) obtém-se a precisão analítica na forma de desvio padrão. Em (c) é obtido o valor para a estimativa da variância entre-frascos ( $S^2_{sam}$ ), que é obtido pela diferença entre a variância da somatória dos resultados/2 ( $var S/2$ ) e a variância analítica, sendo depois dividido por 2. Para obter o valor da variância permissível entre-amostras ( $\sigma^2_{all}$ ), calculado em (d), é necessário ter o valor do desvio padrão alvo ( $\sigma_p$ ) que é obtido pela função de Horwitz<sup>40,77</sup>. O valor crítico para o estudo de homogeneidade, chamado  $c$ , é calculado em (e), sendo obtido pela multiplicação de fatores usados no teste de “homogeneidade suficiente” pelos valores de variância permissível entre-amostras ( $\sigma^2_{all}$ ) e da variância analítica ( $s^2_{an}$ ), sendo em seguida esses valores somados. O critério para concluir sobre a homogeneidade é que se “ $S^2_{sam} > c$ ” o teste de homogeneidade falhou e esta não pode ser comprovada; se “ $S^2_{sam} < c$ ” o teste de homogeneidade foi aceito e esta é comprovada.

TABELA 10 – Teste de homogeneidade entre frascos, aplicado aos dados de MeHg

FRASCO N.	RESULTADO 1 (A) $\mu\text{g g}^{-1}$	RESULTADO 2 (B) $\mu\text{g g}^{-1}$	D = a - b	S = a + b	D <sup>2</sup> = (a - b) <sup>2</sup>
2	0,296	0,296	0,000	0,591	0,000
9	0,194	0,241	-0,047	0,436	0,002
14	0,291	0,332	-0,041	0,624	0,002
26	0,245	0,255	-0,010	0,500	0,0001
31	0,379	0,226	0,153	0,606	0,023
36	0,382	0,332	0,050	0,714	0,003
50	0,329	0,329	0,000	0,657	0,0000001
55	0,217	0,237	-0,019	0,454	0,0004
63	0,208	0,215	-0,007	0,422	0,00005
78	0,243	0,224	0,019	0,468	0,0004
Somatorias			<b>0,098</b>	<b>5,471</b>	<b>0,031</b>

Item (a)  $s_{an}^2 = \frac{D^2}{2 \cdot m} = 0,031 / (2 \cdot 10) = 0,00153 \mu\text{g g}^{-1}$  (variância analítica)

Item (b)  $s_{an} = \sqrt{S_{an}^2} = \sqrt{0,00153} = 0,0391 \mu\text{g g}^{-1}$  (precisão analítica expressa como desvio padrão)

Item (c)  $S_{sam}^2 = (s_s^2 / 2 - S_{an}^2) / 2 = (0,011 / 2 - 0,00153) / 2 = 0,001985$

Item (d)  $\sigma_{all}^2 = (0,3 \times \sigma_p)^2 = (0,3 \times 0,05326)^2 = 0,0002553 \mu\text{g kg}^{-1}$

$\sigma_p$  (obtido pela função de Horwitz) =  $0,02 \cdot c^{0,8495} = 0,02 \cdot (0,274 \cdot 10^{-6})^{0,8495} / 10^{-6} = 0,05326 \mu\text{g g}^{-1}$  (sendo c a concentração média obtida de MeHg expressa como fração de massa)

Item (e)  $c = F_1 \sigma_{all}^2 + F_2 s_{an}^2 = 1,88 \times 0,0002553 + 1,01 \times 0,00153 = 0,002025$

Usando o critério, tendo  $S_{sam}^2 = 0,001985 < c = 0,002025$  a homogeneidade é comprovada.

A estimativa da incerteza para homogeneidade foi calculada através da equação 2 anteriormente explicada no item 4.4.1.

$$u_{bb} = \sqrt{\frac{MQ_{dentro}}{n}} \times \sqrt[4]{\frac{2}{df_{dentro}}}$$

Onde:  $MQ_{dentro}$  é estatisticamente igual a variância analítica obtida no item (a), pois  $MQ_{dentro}$ , também chamada de variação dentro dos grupos, é definida como a somatória do

número de medidas subtraindo uma ( $n_j - 1$ ) multiplicada pela variância de cada grupo de dados e finalmente dividida pelo valor dos graus de liberdade. Assim,

$$u_{bb} = \sqrt{\frac{0,00153}{20}} \times \sqrt[4]{\frac{2}{10}} = 0,008746 \times 0,6687 = 0,005849 \mu\text{g g}^{-1}$$

Conforme citado no item 4.4.1, uma análise de tendência nos dados foi realizada com o propósito de verificar a existência ou não de tendência nos resultados das medições para o teste de homogeneidade.

### 7.3.3 Análise de tendência nas medições para estudo de homogeneidade para Hg total

No caso do estudo de homogeneidade, as expressões matemáticas são as mesmas descritas no item 4.4.2 para a análise de tendência no estudo de estabilidade. Dessa forma, as equações 6, 7 e 8, apresentadas na página 21, foram utilizadas para essa análise. Assim, temos que  $b_1 = 2,6714$ ;  $b_0 = 281,900$ ;  $s = 27,2244$  e finalmente  $s(b_1) = 2,9973$ , e a condição que deve ser provada é que  $|b_1| < t_{0,95,n-2} \cdot s(b_1)$ .

Tendo  $t_{0,95,8} = 2,31$ , então  $t_{0,95,n-2} \cdot s(b_1) = 6,9238$ ; portanto  $|b_1|$  é menor e assim comprova-se que nenhuma tendência foi observada.

Uma alternativa para se comprovar a análise de tendência consiste em avaliar a análise resultante, da tabela de variação, a partir da regressão. Na tabela, o valor-P (definido como p-value<sup>78</sup>) é igual ao valor de probabilidade  $P(t \geq t \text{ observado})$ , onde “t” significa o teste t. O critério na análise de regressão é que quando comparado com o nível de significância adotado (igual a 0,05) o valor-P deve ser menor para aceitar a regressão. Caso o valor de p for maior que 0,05, indica que não há tendência<sup>78</sup>. Na TAB. 11 são mostrados os resultados para estatística de regressão realizados com excel.

TABELA 11 – Dados obtidos com medições de Hg total na estatística de regressão

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>
Interseção	281,90	18,86	14,95	3,95E-07
Variável X 1	2,67	3,04	0,88	0,40

Como o valor-P para a variável X1 é maior que 0,05, a regressão é insignificante e não há tendência.

### 7.3.4 Análise de tendência nas medições para estudo de homogeneidade para MeHg

Para obtenção dos resultados, as equações 6, 7 e 8, apresentadas na página 21, foram utilizadas. Dessa forma, temos que  $b_1 = -2,9922$ ;  $b_0 = 294,899$ ;  $s = 36,0864$  e finalmente  $s(b_1) = 7,9105$ , e a condição que deve ser provada é que  $|b_1| < t_{0,95,n-2} \cdot s(b_1)$ .

Tendo  $t_{0,95,8} = 2,31$ , então  $t_{0,95,n-2} \cdot s(b_1) = 18,273$ ; portanto  $|b_1|$  é menor e assim comprova-se que nenhuma tendência foi observada.

Na TAB. 12 são mostrados os resultados para estatística de regressão realizados com excel.

TABELA 12 – Dados obtidos com medições de MeHg na estatística de regressão

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>
Interseção	294,89	49,08	6,01	0,0003
Variável X 1	-2,99	7,91	-0,38	0,72

Como o valor-P para a variável X1 é maior que 0,05, a regressão é insignificante e não há tendência.

### 7.4 Estudo da massa mínima

Após a seleção de um dos frascos, pesou-se porções de massas no intervalo de 0,200 a 0,800 g do material liofilizado e realizou-se as determinações de mercúrio total por meio da técnica de FIA-CV-AAS. Este intervalo de massa foi selecionado com base no processo de validação do método analítico.

Na FIG. 12 é mostrada a relação dos desvios padrão obtidos com o intervalo de massa. Observa-se que o valor médio dos desvios foi igual a  $0,008 \pm 0,001 \mu\text{g g}^{-1}$  (Hg total) representando uma variação de 1,5 a 2,2% em relação a massa.

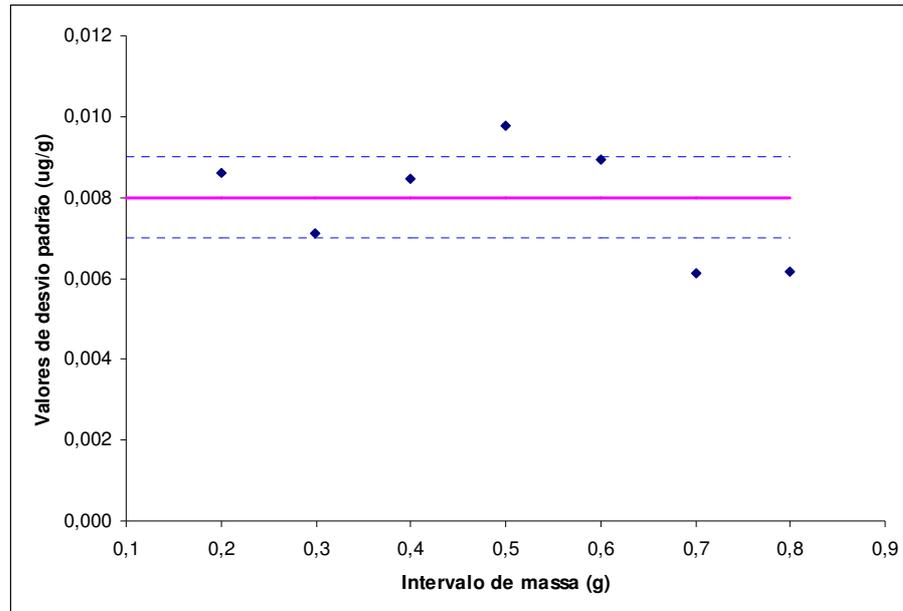


FIGURA 12 – Desvios padrão obtidos na determinação de mercúrio total no intervalo de massa

Pelos resultados obtidos verificou-se que em toda a faixa de massa estudada os desvios se mostraram satisfatórios, indicando que, para a metodologia analítica empregada é possível a utilização de uma massa mínima de até 0,2 g.

## 7.5 Estudo de estabilidade

### 7.5.1 Estabilidade para mercúrio total (Hg total) nas temperaturas de 20 °C e 40 °C

A estabilidade do material foi determinada através da análise de resíduos dos valores de concentração obtidos ao longo do tempo. Este teste consiste em observar se a regressão linear dos valores de concentração apresenta alguma tendência. Se a inclinação da reta ou a não linearidade da mesma não forem significativas, ou seja, se a concentração do analito não variar em função do tempo, o material é considerado estável.

Os resultados obtidos nas medições para Hg total, nas temperaturas de 20 °C e 40 °C, estão mostrados nas TAB. 13 e 15.

TABELA 13 – Resultados obtidos para estudo de estabilidade de Hg total na temperatura de 20 °C

Tempo (meses)	Concentração de Hg ± desvio padrão (µg g <sup>-1</sup> )
0	0,300 ± 0,027 (9%)*
1,2	0,350 ± 0,035 (10%)
2,3	0,350 ± 0,035 (10%)
5	0,335 ± 0,017 (5%)
12	0,344 ± 0,034 (10%)

\*O valor entre parênteses representa o desvio padrão percentual

Dessa forma, tem-se que  $\bar{X}$  (tempo médio) = 4,1 meses e  $\bar{Y}$  (concentração média) = 0,336 µg g<sup>-1</sup>.

Para obtenção dos resultados, as equações 6, 7 e 8, apresentadas na página 21, foram utilizadas. Dessa forma, temos que o estimador para a inclinação ( $b_1$ ) é igual a 0,001572, a estimativa para a intersecção ( $b_0$ ) é igual a 0,32936 e a incerteza associada à inclinação ( $s(b_1)$ ) é igual a 0,002356.

Como descrito anteriormente, se a condição  $|b_1| < t_{0,95, n-2} \cdot s(b_1)$  for confirmada nenhuma instabilidade será observada. Então, como a segunda parte da condição ( $t_{0,95, n-2} \cdot s(b_1)$ ) é igual a 0,007496,  $|b_1|$  é menor, portanto o analito é considerado estável nessa temperatura.

Adicionalmente, foi realizada a análise resultante, da tabela de variação, a partir da regressão. Na TAB. 14 são mostrados os resultados.

TABELA 14 – Análise da tabela de variação para regressão linear de dados de estabilidade de Hg total no MRC, em temperatura de 20 °C

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>
Intersecção	0.33	0.01	23.58	0.0002
Variável X 1	0.0016	0.002	0.67	0.55

O valor-P (definido como p-value) é igual ao valor de probabilidade  $P(t \geq t_{\text{observado}})$ . Quando comparado com o nível de significância adotado (igual a 0,05) o valor-P deve ser menor para aceitar a regressão. Considerando-se que o valor P foi maior que 0,05, a regressão não é aceita e assim, este analito é considerado estável, por no mínimo 12 meses (365 dias), a esta temperatura.

TABELA 15 – Resultados obtidos para estudo de estabilidade de Hg total na temperatura de 40 °C

Tempo (meses)	Concentração de Hg ± desvio padrão ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
0	0,302 ± 0,024 (8%)*
1,2	0,330 ± 0,023 (7%)
2,3	0,350 ± 0,038 (11%)
5	0,345 ± 0,017 (5%)
12	0,289 ± 0,024 (8%)

\*O valor entre parênteses representa o desvio padrão percentual

Dessa forma, tem-se que  $\bar{X}$  (tempo médio) = 4,1 meses e  $\bar{Y}$  (concentração média) = 0,323  $\mu\text{g g}^{-1}$ .

Para obtenção dos resultados, as equações 6, 7 e 8, apresentadas na página 21, foram utilizadas. Dessa forma, temos que o estimador para a inclinação ( $b_1$ ) é igual a -0,002526, a estimativa para a intersecção ( $b_0$ ) é igual a 0,33356 e a incerteza associada à inclinação ( $s(b_1)$ ) é igual a 0,002875.

Como descrito anteriormente, se a condição  $|b_1| < t_{0,95, n-2} \cdot s(b_1)$  for confirmada nenhuma instabilidade será observada. Como a segunda parte da condição ( $t_{0,95, n-2} \cdot s(b_1)$ ) é igual a 0,009149,  $|b_1|$  é menor, portanto o analito é considerado estável nessa temperatura.

Adicionalmente, foi realizada a análise resultante, da tabela de variação, a partir da regressão. Na TAB. 16 são mostrados os resultados.

TABELA 16 – Análise da tabela de variação para regressão linear de dados de estabilidade de Hg total no MRC, em temperatura de 40 °C

	<i>Coeficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>
Intersecção	0.33	0.02	19.57	0.0003
Variável X 1	-0.003	0.003	-0.88	0.44

Considerando-se que o valor P foi maior que 0,05, este analito é considerado estável, por no mínimo 12 meses (365 dias), a esta temperatura.

#### 7.5.1.1 Estimativa da incerteza para a estabilidade de Hg total

Segundo a norma ISO Guia 35<sup>13</sup> a contribuição da incerteza devida à estabilidade a longo prazo é obtida pela expressão:

$$u_{lts} = s_b \cdot t \quad (32)$$

onde  $u_{its}$  é a contribuição da incerteza para a estabilidade,  $S_b$  é o valor do erro padrão da variável X obtido na análise de regressão linear dos dados de estabilidade e t é o tempo total, em meses, utilizado para testar a estabilidade. Então, temos que:

$$u_{its_{20C}} = 0,002356 \times 12 = 0,02827$$

$$u_{its_{40C}} = 0,002875 \times 12 = 0,0345$$

Expressando a incerteza na unidade de concentração deste analito temos que a estimativa da incerteza na estabilidade a 20 °C é igual a 0,02827  $\mu\text{g g}^{-1}$  e a estimativa da incerteza na estabilidade a 40 °C é igual a 0,0345  $\mu\text{g g}^{-1}$ .

### 7.5.2 Estabilidade para mercúrio total (Hg total) na temperatura de 8 °C.

Os resultados obtidos nas medições para Hg total, na temperatura de 8 °C, estão mostrados na TAB. 17.

TABELA 17 – Resultados obtidos para estudo de estabilidade de Hg total na temperatura de 8 °C

Tempo (meses)	Concentração de Hg $\pm$ desvio padrão ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
0	0,300 $\pm$ 0,018 (6%)*
3	0,288 $\pm$ 0,016 (6%)
6	0,355 $\pm$ 0,017 (5%)

\*O valor entre parênteses representa o desvio padrão percentual

Dessa forma, tem-se que  $\bar{X}$  (tempo médio) = 3 meses e  $\bar{Y}$  (concentração média) = 0,314  $\mu\text{g g}^{-1}$ .

Para obtenção dos resultados, as equações 6, 7 e 8, apresentadas na página 21, foram utilizadas. Dessa forma, temos que o estimador para a inclinação ( $b_1$ ) é igual a 0,009167, a estimativa para a intersecção ( $b_0$ ) é igual a 0,28683 e a incerteza associada à inclinação ( $s(b_1)$ ) é igual a 0,007602.

Como descrito anteriormente, se a condição  $|b_1| < t_{0,95, n-2} \cdot s(b_1)$  for confirmada nenhuma instabilidade será observada. Então, como a segunda parte da condição ( $t_{0,95, n-2} \cdot s(b_1)$ ) é igual a 0,09659,  $|b_1|$  é menor, portanto o analito é considerado estável nessa temperatura.

Adicionalmente, foi realizada a análise resultante, da tabela de variação, a partir da regressão. Na TAB. 18 são mostrados os resultados.

TABELA 18 – Análise da tabela de variação para regressão linear de dados de estabilidade de Hg total no MRC, em temperatura de 8 °C

	<i>Coeficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>
Interseção	0.29	0.03	9.74	0.07
Variável X 1	0.009	0.008	1.21	0.44

Considerando-se que o valor P foi maior que 0,05, este analito é considerado estável, por no mínimo 6 meses (180 dias), a esta temperatura.

### 7.5.3 Estabilidade para metilmercúrio (MeHg) nas temperaturas de 20 °C e 40 °C

Os resultados obtidos nas medições para MeHg, nas temperaturas de 20 °C e 40 °C, estão mostrados nas TAB. 19 e 21.

TABELA 19 – Resultados obtidos para estudo de estabilidade de MeHg na temperatura de 20 °C

Tempo (dias)	Concentração de MeHg ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) $\pm$ desvio padrão
0	0,267 $\pm$ 0,032 (12%)*
1,2	0,235 $\pm$ 0,024 (10%)
2,3	0,237 $\pm$ 0,024 (10%)
5	0,237 $\pm$ 0,033 (14%)
12	0,235 $\pm$ 0,033 (14%)

\* O valor entre parênteses representa o desvio padrão percentual

Dessa forma, tem-se que  $\bar{X}$  (tempo médio) = 4,1 meses e  $\bar{Y}$  (concentração média) = 0,242  $\mu\text{g g}^{-1}$ .

Para obtenção dos resultados, as equações 6, 7 e 8, apresentadas na página 21, foram utilizadas. Dessa forma, temos que o estimador para a inclinação ( $b_1$ ) é igual a - 0,0014507, a estimativa para a intersecção ( $b_0$ ) é igual a 0,24815 e a incerteza associada à inclinação ( $s(b_1)$ ) é igual a 0,0014520.

Como descrito anteriormente, se a condição  $|b_1| < t_{0,95, n-2} \cdot s(b_1)$  for confirmada nenhuma instabilidade será observada. Como a segunda parte da condição ( $t_{0,95, n-2} \cdot s(b_1)$ ) é igual a 0,004620,  $|b_1|$  é menor, portanto o analito é considerado estável nessa temperatura.

Adicionalmente, foi realizada a análise resultante, da tabela de variação, a partir da regressão. Na TAB. 20 são mostrados os resultados.

TABELA 20 – Análise da tabela de variação para regressão linear de dados de estabilidade de MeHg no MRC, em temperatura de 20 °C

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>
Interseção	0.25	0.009	28.83	9.16E-05
Variável X 1	-0.001	0.001	-0.10	<b>0.39</b>

Considerando-se que o valor P foi maior que 0,05, este analito é considerado estável, por no mínimo 12 meses (365 dias), a esta temperatura.

TABELA 21 – Resultados obtidos para estudo de estabilidade de MeHg na temperatura de 40 °C

Tempo (dias)	Concentração de MeHg ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) $\pm$ desvio padrão
0	0,269 $\pm$ 0,038 (14%)*
1,2	0,224 $\pm$ 0,030 (14%)
2,3	0,217 $\pm$ 0,035 (16%)
5	0,263 $\pm$ 0,032 (12%)
12	0,256 $\pm$ 0,033 (13%)

\*O valor entre parênteses representa o desvio padrão percentual

Dessa forma, tem-se que  $\bar{X}$  (tempo médio) = 4,1 meses e  $\bar{Y}$  (concentração média) = 0,246  $\mu\text{g g}^{-1}$ .

Para obtenção dos resultados, as equações 6, 7 e 8, apresentadas na página 21, foram utilizadas. Dessa forma, temos que o estimador para a inclinação ( $b_1$ ) é igual a 0,0012653, a estimativa para a intersecção ( $b_0$ ) é igual a 0,24061 e a incerteza associada à inclinação ( $s(b_1)$ ) é igual a 0,0027606.

Como descrito anteriormente, se a condição  $|b_1| < t_{0,95, n-2} \cdot s(b_1)$  for confirmada nenhuma instabilidade será confirmada. Como a segunda parte da condição ( $t_{0,95, n-2} \cdot s(b_1)$ ) é igual a 0,008784,  $|b_1|$  é menor, portanto o analito é considerado estável nessa temperatura.

Adicionalmente, foi realizada a análise resultante, da tabela de variação, a partir da regressão. Na TAB. 22 são mostrados os resultados.

TABELA 22 – Análise da tabela de variação para regressão linear de dados de estabilidade de MeHg no MRC, em temperatura de 40 °C

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>
Interseção	0.24	0.02	14.70	0.0007
Variável X 1	0.001	0.003	0.46	<b>0.68</b>

Considerando-se que o valor P foi maior que 0,05, este analito é considerado estável, por no mínimo 12 meses (365 dias), a esta temperatura.

### 7.5.3.1 Estimativa da incerteza para a estabilidade de MeHg

Segundo a norma ISO Guia 35<sup>13</sup> a contribuição da incerteza devida à estabilidade a longo prazo é obtida pela expressão:

$$u_{lts} = S_b \cdot t$$

onde  $u_{lts}$  é a contribuição da incerteza para a estabilidade,  $S_b$  é o valor do erro padrão da variável X obtido na análise de regressão linear dos dados de estabilidade e t é o tempo total, em meses, utilizado para testar a estabilidade. Então, temos que:

$$u_{lts_{20C}} = 0,0014520 \times 12 = 0,017424$$

$$u_{lts_{40C}} = 0,0027606 \times 12 = 0,0331272$$

Expressando a incerteza na unidade de concentração deste analito temos que a estimativa da incerteza na estabilidade a 20 °C é igual a 0,017424  $\mu\text{g g}^{-1}$  e a estimativa da incerteza na estabilidade a 40 °C é igual a 0,03313  $\mu\text{g g}^{-1}$ .

### 7.5.4 Estabilidade para metilmercúrio (MeHg) na temperatura de 8 °C.

Os resultados obtidos nas medições para MeHg, na temperatura de 8 °C, estão mostrados na TAB. 23.

TABELA 23 – Resultados obtidos para estudo de estabilidade de MeHg na temperatura de 8 °C

Tempo (dias)	Concentração de MeHg ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) $\pm$ desvio padrão
0	0,267 $\pm$ 0,035 (13%)*
3	0,333 $\pm$ 0,032 (10%)
6	0,253 $\pm$ 0,040 (16%)

\* O valor entre parênteses representa o desvio padrão percentual

Dessa forma, tem-se que  $\bar{X}$  (tempo médio) = 3 meses e  $\bar{Y}$  (concentração média) = 0,284  $\mu\text{g g}^{-1}$ .

Para obtenção dos resultados, as equações 6, 7 e 8, apresentadas na página 21, foram utilizadas. Dessa forma, temos que o estimador para a inclinação ( $b_1$ ) é igual a -

0,002333, a estimativa para a intersecção ( $b_0$ ) é igual a 0,29133 e a incerteza associada à inclinação ( $s(b_1)$ ) é igual a 0,0140489.

Como descrito anteriormente, se a condição  $|b_1| < t_{0,95, n-2} \cdot s(b_1)$  for confirmada nenhuma instabilidade será observada. Então, como a segunda parte da condição ( $t_{0,95, n-2} \cdot s(b_1)$ ) é igual a 0,178505,  $|b_1|$  é menor, portanto o analito é considerado estável nessa temperatura.

Adicionalmente, foi realizada a análise resultante, da tabela de variação, a partir da regressão. Na TAB. 24 são mostrados os resultados.

TABELA 24 – Análise da tabela de variação para regressão linear de dados de estabilidade de MeHg no MRC, em temperatura de 8 °C

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>
Intersecção	0.29	0.05	5.35	0.12
Variável X 1	-0.002	0.01	-0.17	0.89

Considerando-se que o valor P foi maior que 0,05, este analito é considerado estável, por no mínimo 6 meses (180 dias), a esta temperatura.

## 7.6 Determinação de mercúrio, metilmercúrio e chumbo nas amostras do material candidato a material de referência pela técnica de IDMS

Neste trabalho, as concentrações de mercúrio e chumbo nas amostras foram determinadas pela técnica de IDMS com adição de dois traçadores simultaneamente ( $\text{Hg}^{202}$  e  $\text{Pb}^{207}$ ). Para a determinação de metilmercúrio, como mencionado em 6.4.3, o mesmo traçador de  $^{202}\text{Hg}$  foi adicionado nas amostras e a concentração desse analito determinada.

Conforme exposto no item 6.4, essas determinações envolvem as calibrações das soluções dos traçadores, análise isotópica dos analitos e cálculo das concentrações dos analitos nas amostras. Nos itens a seguir são apresentados os resultados de cada etapa.

### 7.6.1 Calibração da solução de traçador de mercúrio

A TAB. 25 apresenta os dados analíticos empregados no cálculo da concentração de mercúrio na solução do traçador isotópico enriquecido em  $\text{Hg}^{202}$ . A concentração encontrada a partir da equação 12 foi igual a  $0,130 \mu\text{g g}^{-1}$ , a qual foi empregada na preparação da solução diluída, adicionada nas amostras, com concentração igual a  $0,013 \mu\text{g g}^{-1}$ .

TABELA 25 – Calibração da solução do traçador isotópico enriquecido em Hg<sup>202</sup>

MISTURA	MASSA DE TRAÇADOR (g)	MASSA DO PADRÃO (g)	RAZÃO ISOTÓPICA <sup>200</sup> Hg/ <sup>202</sup> Hg média ± desvio padrão	CONCENTRAÇÃO DE MERCÚRIO (µg g <sup>-1</sup> )
1	1,36362	5,01333	0,428 ± 0,004	0,12937
2	1,34229	5,00782	0,432 ± 0,003	0,13006
3	1,35493	5,00920	0,434 ± 0,003	0,13066
				0,130 ± 0,002 (média ± incerteza*)

\*incerteza expandida com k = 2, nível de confiança igual a 95%, calculada através da equação 26, página 43.

### 7.6.2 Calibração da solução de traçador de chumbo

A TAB. 26 apresenta os dados analíticos empregados no cálculo da concentração de chumbo na solução do traçador isotópico enriquecido em Pb<sup>207</sup>. A concentração encontrada a partir da equação 12 (página 34) foi igual a 0,022 µg g<sup>-1</sup>, a qual foi empregada na preparação da solução diluída, adicionada nas amostras, com concentração igual a 0,001 µg g<sup>-1</sup>.

TABELA 26 – Calibração da solução do traçador isotópico enriquecido em <sup>207</sup>Pb

MISTURA	MASSA DE TRAÇADOR (g)	MASSA DO PADRÃO (g)	RAZÃO ISOTÓPICA <sup>206</sup> Pb/ <sup>207</sup> Pb média ± desvio padrão	CONCENTRAÇÃO DE CHUMBO (µg g <sup>-1</sup> )
1	0,20685	8,00919	1,024 ± 0,003	0,023
2	0,20172	8,00218	1,027 ± 0,005	0,022
3	0,20513	8,00268	1,026 ± 0,006	0,022
				0,0220 ± 0,0001 (média ± incerteza*)

\*incerteza expandida com k = 2, nível de confiança igual a 95%, calculada através das equações 27 e 28.

### 7.6.3 Determinação da concentração de mercúrio e chumbo pela técnica de IDMS

Como mencionado no item 4.7.2, as medidas de abundâncias isotópicas por espectrometria de massa são afetadas pelo efeito do fracionamento, exigindo que as razões isotópicas sejam corrigidas. Webster<sup>79</sup> estudando o efeito do fracionamento isotópico nas análises pela técnica de IDMS concluiu que este efeito torna-se desprezível quando a concentração da solução do traçador é obtida pela mesma técnica. Porém, neste trabalho as

razões isotópicas obtidas foram corrigidas. O valor do fator de discriminação de massa para as razões isotópicas de mercúrio foi igual a 1,0064 e o valor do fator para razões isotópicas de chumbo foi igual a 0,9123.

A técnica de IDMS com adição de dois traçadores permite obter em uma única mistura (amostra e traçadores) duas determinações independentes dos analitos selecionados. Então, com adição dos traçadores  $^{202}\text{Hg}$  e  $^{207}\text{Pb}$  e medidas as razões isotópicas  $^{200}\text{Hg}/^{202}\text{Hg}$  e  $^{206}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$  obteve-se a concentração de mercúrio e chumbo. As TAB. 27 e 28 mostram os dados e resultados dos analitos obtidos nos materiais de referência analisados e nas replicatas das amostras, respectivamente.

TABELA 27 – Resultados da determinação da concentração de mercúrio e chumbo, nos materiais de referência analisados, obtidos pela técnica de IDMS com adição de dois traçadores ( $^{202}\text{Hg}$  e  $^{207}\text{Pb}$ )

Material de referência	Concentração de mercúrio obtida $\mu\text{g g}^{-1}$	Concentração de mercúrio certificada $\mu\text{g g}^{-1}$	Concentração de Chumbo obtida $\mu\text{g g}^{-1}$	Concentração de Chumbo certificada $\mu\text{g g}^{-1}$
Dorm-2	$4,59 \pm 0,14^{**}$	$4,64 \pm 0,26^*$	$0,071 \pm 0,001^{**}$	$0,065 \pm 0,007^*$
Dolt-2	$1,96 \pm 0,06^{**}$	$1,99 \pm 0,10^*$	$0,180 \pm 0,001^{**}$	$0,22 \pm 0,02^*$

\*Valores de incerteza expandida informados nos certificados dos MRC, com  $k=2$ , nível de confiança = 95%.

\*\*Valores de incerteza expandida calculados neste trabalho conforme item 3.5.2, com  $k=2$ , nível de confiança = 95%.

TABELA 28 – Resultados da determinação da concentração de mercúrio e chumbo, nas replicatas da amostra, obtidos pela técnica de IDMS com adição de dois traçadores ( $^{202}\text{Hg}$  e  $^{207}\text{Pb}$ )

Amostra	Razão Isotópica $^{200}\text{Hg}/^{202}\text{Hg}^*$ média $\pm$ desvio padrão	Razão Isotópica $^{206}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}^*$ média $\pm$ desvio padrão	Concentração de mercúrio $\mu\text{g g}^{-1}$	Concentração de Chumbo $\mu\text{g g}^{-1}$
1	$0,721 \pm 0,007$	---	0,270	---
2	$0,723 \pm 0,007$	$1,016 \pm 0,010$	0,277	0,0434
3	$0,720 \pm 0,010$	$1,009 \pm 0,009$	0,269	0,0420
4	$0,722 \pm 0,006$	$1,024 \pm 0,007$	0,274	0,0450
5	$0,727 \pm 0,008$	$1,020 \pm 0,009$	0,291	0,0434
6	$0,715 \pm 0,007$	$1,015 \pm 0,012$	0,246	0,0430
			$0,271 \pm 0,014$ (média $\pm$ desvio)	$0,0433 \pm 0,0011$ (média $\pm$ desvio)

\*As razões isotópicas estão corrigidas pelo efeito de discriminação de massa.

#### 7.6.4 Determinação da concentração de metilmercúrio pela técnica de IDMS

Conforme mencionado em 6.4.3, foi adicionada uma massa do traçador  $^{202}\text{Hg}$  nas amostras percoladas pela resina de troca iônica e que receberam o tratamento da luz ultravioleta. Em seguida, a razão isotópica  $^{200}\text{Hg}/^{202}\text{Hg}$  foi medida e a concentração de mercúrio, referente a metilmercúrio, foi determinada. As TAB. 29 e 30 mostram os dados e resultados obtidos nos materiais de referência analisados e nas replicatas das amostras, respectivamente.

TABELA 29 – Resultados da determinação da concentração de metilmercúrio, nos materiais de referência analisados, obtidos pela técnica de IDMS com adição do traçador  $^{202}\text{Hg}$

Material de referência	Concentração de metilmercúrio obtida $\mu\text{g g}^{-1}$	Concentração de metilmercúrio certificada $\mu\text{g g}^{-1}$
Dorm-2	$4,22 \pm 0,13^{**}$	$4,47 \pm 0,32^*$
Dolt-2	$0,680 \pm 0,022^{**}$	$0,693 \pm 0,053^*$

\*Valores de incerteza expandida informados nos certificados dos MRC, com  $k=2$ , nível de confiança = 95%.

\*\*Valores de incerteza expandida calculados neste trabalho conforme item 3.5.2, com  $k=2$ , nível de confiança = 95%.

TABELA 30 – Resultados da determinação da concentração de metilmercúrio, nas replicatas da amostra, obtidos pela técnica de IDMS com adição do traçador  $^{202}\text{Hg}$

Amostra	Razão Isotópica $^{200}\text{Hg}/^{202}\text{Hg}^*$ média $\pm$ desvio padrão	Concentração de mercúrio (como metilmercúrio) $\mu\text{g g}^{-1}$
1	$0,690 \pm 0,037$	0,239
2	$0,688 \pm 0,033$	0,241
3	$0,689 \pm 0,020$	0,230
4	$0,696 \pm 0,033$	0,274
5	$0,689 \pm 0,027$	0,244
6	$0,690 \pm 0,035$	0,242
		$0,245 \pm 0,015$ (média $\pm$ desvio)

\*As razões isotópicas estão corrigidas pelo efeito de discriminação de massa.

### 7.7 Estimativa da incerteza associada ao valor certificado

Conforme citado em 5.3, a incerteza associada ao valor de propriedade de um MRC pode ser expressa por:

$$\mu_{MRC} = \sqrt{\mu_{car}^2 + \mu_{bb}^2 + \mu_{lts}^2 + \mu_{sts}^2}$$

Com a exclusão do último termo dessa equação, conforme explicado em 5.3.2, a equação fica reduzida às contribuições de incerteza referentes a caracterização ( $\mu_{car}$ ), homogeneidade ( $\mu_{bb}$ ) e estabilidade a longo prazo ( $\mu_{lts}$ ).

No processo de certificação, para a técnica analítica IDMS, o elevado número de fontes de incerteza contribuem consideravelmente na obtenção do valor da incerteza expandida associado ao resultado da concentração do analito. Na TAB. 31 são apresentados os valores de cada fonte de incerteza, sua incerteza padrão associada e a incerteza relativa, para a certificação de Hg total. Na FIG. 13, são mostradas as contribuições de incerteza relativa para cada fonte, para o mesmo analito.

TABELA 31 – Valores de cada fonte de incerteza, sua incerteza padrão associada e a incerteza relativa, para a certificação de Hg total

Fonte <sup>(*)</sup>	Valor (x)	incerteza padrão ( $\mu(x)$ )	incerteza relativa ( $\mu(x)/x$ )
Csp	0,130	0,002	0,014538
Wsp	0,20000	0,00002	0,0001
Ws	0,40000	0,00002	0,00005
Ars	199,968309	0,000003	1,50024E-08
Arsp	201,970625	0,000003	1,48536E-08
Asp	97,6859	0,0034	3,4805E-05
As	23,073	0,029	0,0012568
Rm	0,7218	0,0003	0,00045719
Rsp	0,005499	0,00003	0,005455537
Rs	1,2841	0,00099	0,000770968

(\*) C<sub>sp</sub> = concentração do analito no traçador (spike → sp) ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ); W<sub>sp</sub> = massa do traçador (g); W<sub>s</sub> = massa da amostra (g); A<sub>rs</sub> = Massa atômica do analito na amostra; A<sub>rsp</sub> = Massa atômica do analito referência no traçador; A<sub>sp</sub> = Abundância do isótopo de referência (enriquecido) no traçador (isótopo a) (%); A<sub>s</sub> = Abundância do isótopo na amostra (isótopo b); R<sub>m</sub> = Razão isotópica (isótopo b /isótopo a) na mistura; R<sub>sp</sub> = Razão isotópica (isótopo b /isótopo a) no traçador; R<sub>s</sub> = Razão isotópica (isótopo a /isótopo b) na amostra.

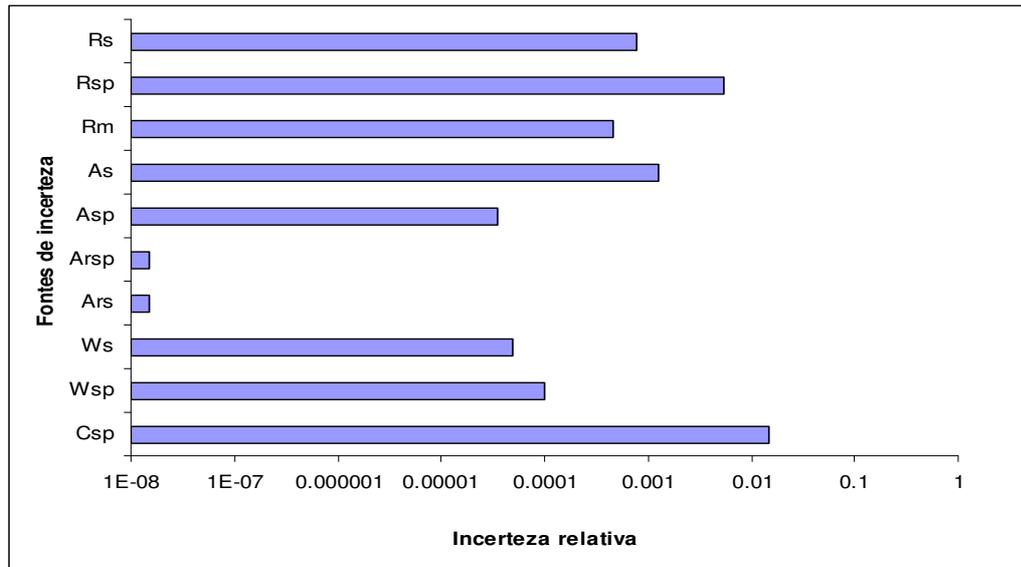


FIGURA 13 – Contribuição das incertezas na caracterização de Hg total

Na TAB. 32 são apresentados os valores de cada fonte de incerteza, sua incerteza associada e a incerteza relativa, para a certificação de MeHg. Na FIG. 14, são mostradas as contribuições de incerteza relativa para cada fonte, para o mesmo analito.

TABELA 32 – Valores de cada fonte de incerteza, sua incerteza padrão associada e a incerteza relativa, para a certificação de MeHg

Fonte <sup>(*)</sup>	Valor (x)	incerteza padrão ( $\mu(x)$ )	incerteza relativa ( $\mu(x)/x$ )
Csp	0,130	0,002	0,014535107
Wsp	0,20000	0,00002	0,0001
Ws	0,40000	0,00002	0,00005
Ars	199,968309	0,000003	1,50024E-08
Arsp	201,970625	0,000003	1,48536E-08
Asp	97,6859	0,0034	3,48054E-05
As	23,073	0,029	0,00125688
Rm	0,6903	0,0003	0,000434594
Rsp	0,005499	0,00003	0,005455537
Rs	1,311	0,004	0,003051804

(\*)  $C_{sp}$  = concentração do analito no traçador (spike  $\rightarrow$  sp) ( $\mu\text{g g}^{-1}$ );  $W_{sp}$  = massa do traçador (g);  $W_s$  = massa da amostra (g);  $A_{rs}$  = Massa atômica do analito na amostra;  $A_{rsp}$  = Massa atômica do analito referência no traçador;  $A_{sp}$  = Abundância do isótopo de referência (enriquecido) no traçador (isótopo a) (%);  $A_s$  = Abundância do isótopo na amostra (isótopo b);  $R_m$  = Razão isotópica (isótopo b /isótopo a) na mistura;  $R_{sp}$  = Razão isotópica (isótopo b /isótopo a) no traçador;  $R_s$  = Razão isotópica (isótopo a /isótopo b) na amostra.

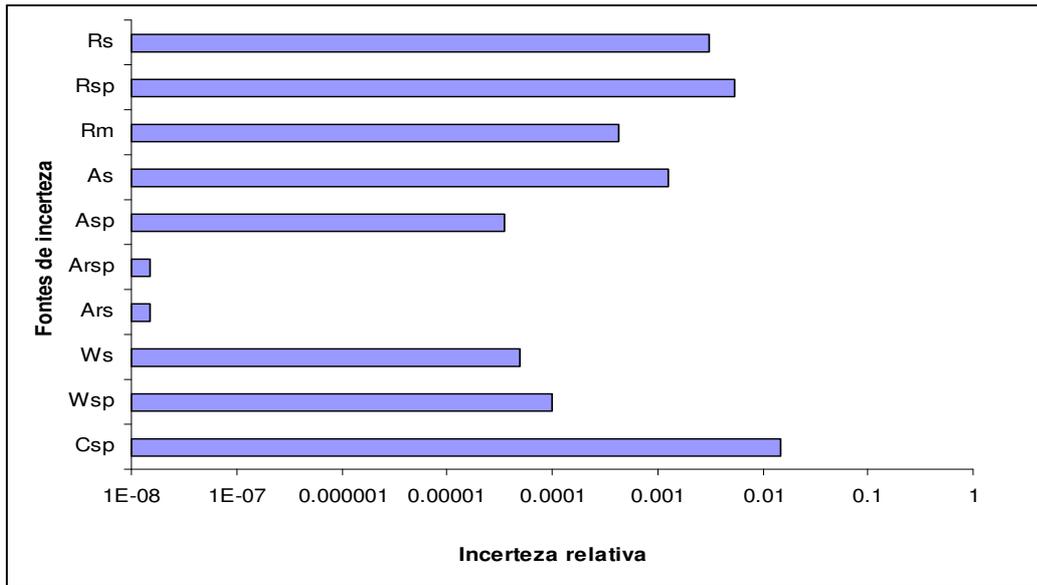


FIGURA 14 – Contribuição das incertezas na caracterização de MeHg

Na TAB. 33 são apresentados os valores de cada fonte de incerteza, sua incerteza associada e a incerteza relativa, para a certificação de MeHg. Na FIG. 15, são mostradas as contribuições de incerteza relativa para cada fonte, para o mesmo analito.

TABELA 33 – Valores de cada fonte de incerteza, sua incerteza padrão associada e a incerteza relativa, para a certificação de Pb

Fonte <sup>(*)</sup>	Valor (x)	incerteza padrão ( $\mu(x)$ )	incerteza relativa ( $\mu(x)/x$ )
Csp	0,001000	0,000004	0,004
Wsp	1,04500	0,00002	1,91388E-05
Ws	0,40000	0,00002	0,00005
Ars	206,0	0,1	0,000485497
Arsp	207,0	0,1	0,000483148
Asp	92,4	0,1	0,001082251
As	24,1442	0,0057	0,000236082
Rm	0,9200	0,0010	0,001086957
Rsp	0,02290	0,00001	0,000436681
Rs	0,860	0,001	0,001162791

(\*)  $C_{sp}$  = concentração do analito no traçador (spike  $\rightarrow$  sp) ( $\mu\text{g g}^{-1}$ );  $W_{sp}$  = massa do traçador (g);  $W_s$  = massa da amostra (g);  $A_{rs}$  = Massa atômica do analito na amostra;  $A_{rsp}$  = Massa atômica do analito referência no traçador;  $A_{sp}$  = Abundância do isótopo de referência (enriquecido) no traçador (isótopo a) (%);  $A_s$  = Abundância do isótopo na amostra (isótopo b);  $R_m$  = Razão isotópica (isótopo b /isótopo a) na mistura;  $R_{sp}$  = Razão isotópica (isótopo b /isótopo a) no traçador;  $R_s$  = Razão isotópica (isótopo a /isótopo b) na amostra.

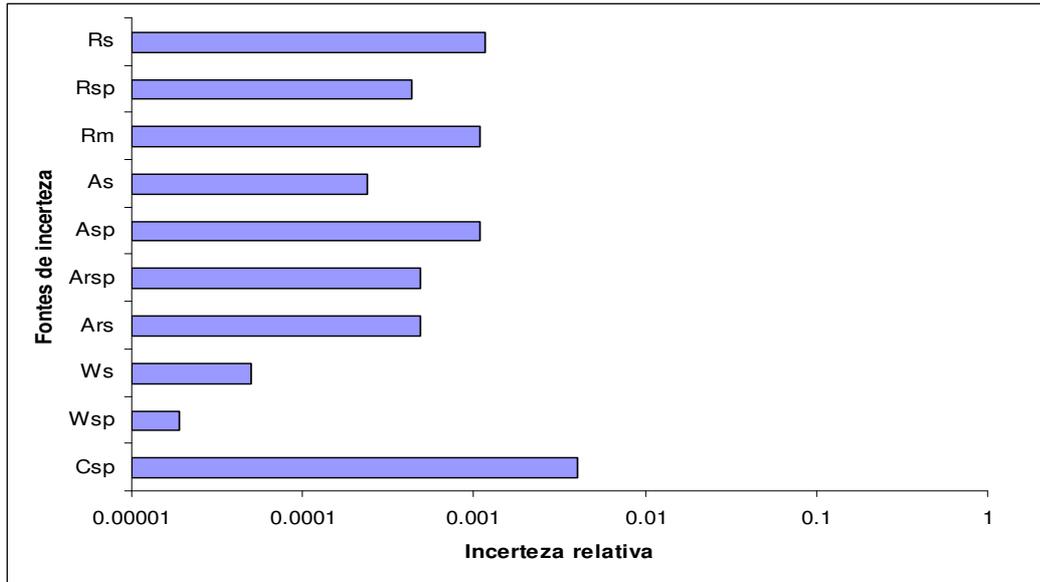


FIGURA 15 – Contribuição das incertezas na caracterização de Pb

Verifica-se que o valor da incerteza relativa para a concentração do analito no traçador ( $C_{sp}$ ) foi a maior contribuição na incerteza da caracterização para todos os analitos. No caso da solução de traçador de mercúrio, a incerteza proveniente da solução original, recebida do fornecedor, contribuiu consideravelmente na incerteza final, pois representa um valor aproximado de 0,7%, enquanto que as pesagens realizadas, para a diluição dessa solução, apresentaram um valor de incerteza relativa não superior a 0,1%. Para a solução de traçador de chumbo, a maior contribuição foi devida a sucessivas diluições executadas para obter a solução final adicionada às amostras.

Na TAB. 34 são apresentados os valores de estimativa das incertezas padrão combinada, obtidos para a caracterização e nos estudos de homogeneidade e estabilidade.

TABELA 34 – Estimativas das incertezas padrão combinadas, em  $\mu\text{g g}^{-1}$ , para os analitos determinados

Analito	Incerteza na caracterização $\mu_{car}$	Incerteza na homogeneidade $\mu_{bb}$	Incerteza na estabilidade a longo prazo $\mu_{lts}$
Hg	0,00423	0,002692	0,02827
MeHg	0,00389	0,005849	0,017424
Pb	0,0002	(*)	(*)

(\*) Para o analito chumbo não foram realizados estudos de homogeneidade e estabilidade.

Para avaliação da contribuição das fontes de incerteza, os resultados da TAB. 34 foram apresentados na FIG. 16 para Hg total e MeHg.

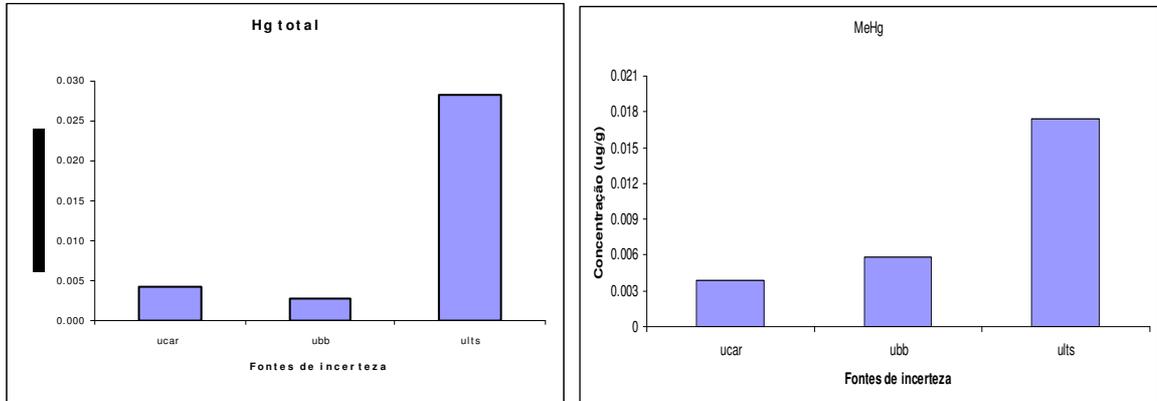


FIGURA 16 – Contribuições da incerteza de caracterização,  $\mu_{car}$ , da incerteza devida à homogeneidade,  $\mu_{bb}$ , e da incerteza devida à estabilidade a longo prazo,  $\mu_{lts}$ , para os analitos Hg e MeHg no candidato a MR de peixe

Verifica-se que a incerteza devida à estabilidade a longo prazo,  $\mu_{lts}$ , foi a maior contribuição à incerteza combinada para os dois analitos, assumindo valores maiores do que as outras fontes de incerteza. Para realização desse cálculo, foi utilizada a equação com base na norma ISO guia 35, que foi apresentada no item 7.5.1.1 deste trabalho.

## 7.8 Incerteza expandida para os analitos Hg total e MeHg

### 7.8.1 Incerteza expandida associada ao valor certificado para mercúrio (Hg)

$$\mu_{c_{MRC_{Hg}}} = \sqrt{(0,00423)^2 + (0,002692)^2 + (0,02827)^2} = 0,02871$$

$$U_{MRC_{Hg}} = 0,02871 \times 2 = 0,057$$

### 7.8.2 Incerteza expandida associada ao valor certificado para metilmercúrio (MeHg)

$$\mu_{c_{MRC_{MeHg}}} = \sqrt{(0,00389)^2 + (0,005849)^2 + (0,017424)^2} = 0,01879$$

$$U_{MRC_{MeHg}} = 0,01879 \times 2 = 0,038$$

### 7.9 Resultados dos valores obtidos de concentração e incerteza expandida associada para os analitos Hg e MeHg

Na TAB. 35 são apresentados os valores de concentração dos analitos certificados acompanhados de sua incerteza expandida (incerteza de certificação). Cabe ressaltar que os valores informados não estão corrigidos para o fator de conversão para massa seca.

TABELA 35 – Valores de concentração dos analitos certificados acompanhados de sua incerteza expandida

Analito	Concentração obtida no MR produzido e incerteza expandida (U) associada $\mu\text{g g}^{-1}$	U (%)
Hg	$0,271 \pm 0,057$	21,0
MeHg	$0,245 \pm 0,038$	15,5

### 7.10 Resultados dos valores obtidos de concentração e incerteza expandida associada para os analitos chumbo (Pb), Arsênio (As) e Cádmiio (Cd)

#### 7.10.1 Resultados dos valores obtidos de concentração e incerteza expandida associada para o analito chumbo (Pb)

Para o analito chumbo não houve estudo de homogeneidade e de estabilidade. Dessa forma, o valor obtido de concentração para esse analito foi considerado como informativo. O valor da incerteza expandida associada ao resultado foi o obtido na determinação do analito por meio da técnica IDMS (incerteza de caracterização). A TAB. 36 apresenta o resultado de concentração com a incerteza associada para chumbo.

TABELA 36 – Valor de concentração do analito chumbo (Pb) acompanhado de sua incerteza expandida

Analito	Concentração obtida no MR produzido e incerteza expandida (U) associada $\mu\text{g g}^{-1}$	U (%)
Pb	$0,043 \pm 0,0004$	1,0

### 7.10.2 Resultados dos valores obtidos de concentração e incerteza expandida associada para o analito arsênio (As)

O analito arsênio (As), incluído neste trabalho, foi determinado através de colaboração com o Laboratório de Análise por Ativação Neutrônica (LAN) do Centro do Reator de Pesquisa (CRPq), do IPEN. Assim, este analito foi incluído como valor informativo, não significando valor certificado. A TAB. 37 apresenta o resultado de concentração com a incerteza associada para arsênio (incerteza de caracterização).

TABELA 37 – Valor de concentração do analito arsênio (As) acompanhado de sua incerteza expandida

Analito	Concentração obtida no MR produzido e incerteza expandida (U) associada $\mu\text{g g}^{-1}$	U (%)
As	$1,42 \pm 0,05$	3,5

### 7.10.3 Resultados dos valores obtidos de concentração e incerteza expandida associada para o analito cádmio (Cd)

Para o analito cádmio (Cd), determinações preliminares foram iniciadas em nosso laboratório, por meio da técnica de espectrometria de massas de alta resolução com fonte de plasma induzido (HRICP-MS). Porém, as mesmas se mostraram inferiores ao limite de quantificação da técnica utilizada ( $LQ = 0,1 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ), portanto não foram obtidos resultados.

### 7.11 Comparação dos resultados obtidos de concentração de Hg e MeHg por diferentes técnicas analíticas

A concentração dos analitos Hg e MeHg foi determinada por meio das técnicas FIA-CV-AAS e IDMS. Dessa forma, há possibilidade de realizar uma comparação dos resultados entre as citadas técnicas. No caso da técnica FIA-CV-AAS, o valor da concentração foi aquele obtido no estudo de homogeneidade, uma vez que, representa um valor médio de 90 resultados para Hg total e de 60 resultados para MeHg.

Nas FIG. 17 e 18 são mostrados os valores das concentrações obtidas de Hg e MeHg, para as duas técnicas analíticas, acompanhados da incerteza expandida.

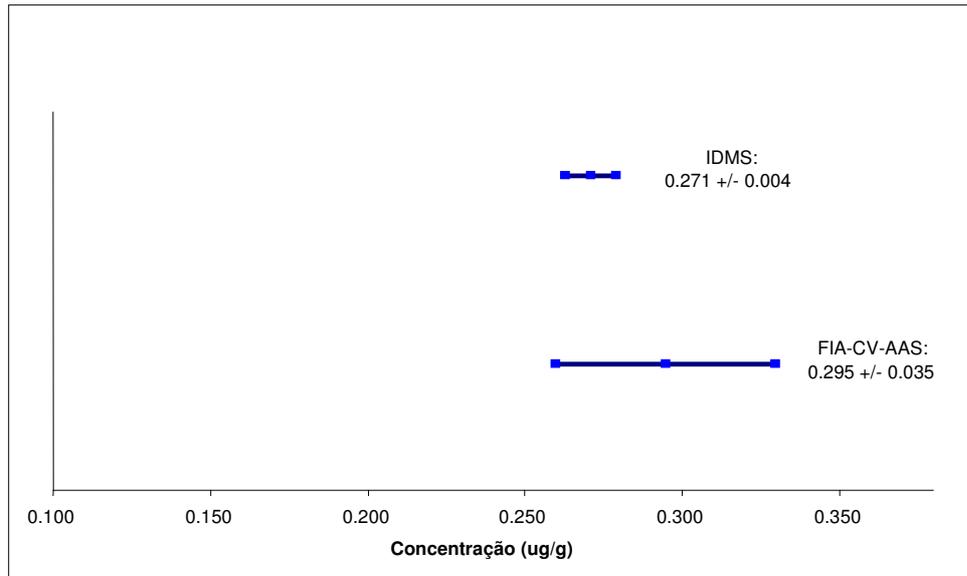


FIGURA 17 – Comparação dos resultados de mercúrio total (Hg) nas técnicas FIA-CV-AAS e IDMS

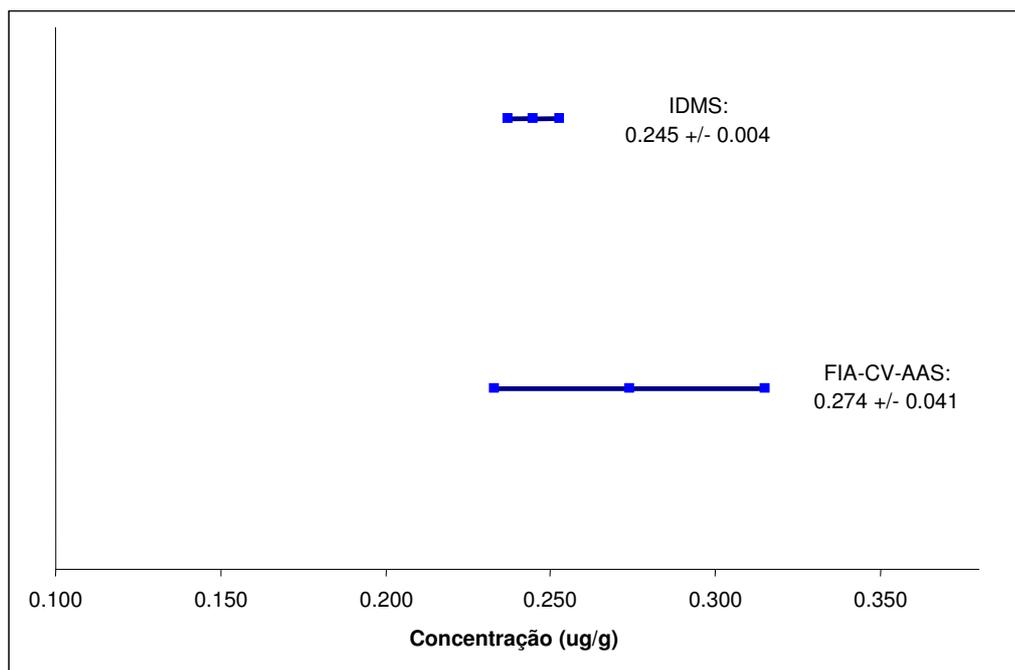


FIGURA 18 – Comparação dos resultados de metilmercúrio (MeHg) nas técnicas FIA-CV-AAS e IDMS

## 8 CONCLUSÕES

Embora siga protocolos claros e bem descritos na literatura, a produção de materiais de referência não é uma tarefa simples. Cada material selecionado possui características específicas, as quais exigem do produtor conhecimento e capacitação técnica, para correções, adequações ou mesmo desenvolvimento de novos protocolos.

Todo o processo envolve a realização de um número muito grande de operações, ensaios e, conseqüentemente, documentação. Dessa forma, a implantação de um sistema de qualidade no laboratório produtor é um requisito fundamental para a garantia da robustez e rastreabilidade de todas as operações.

A acreditação dos ensaios básicos segundo a norma ABNT NBR ISO/IEC 17025 é também um fator extremamente importante. Uma vez acreditado, o laboratório passa por constantes auditorias interna e externa levando a implantação de um rígido e constante controle em todas as operações, permitindo com isso, em contínuo processo de eventuais correções e aprimoramento dos protocolos.

Outro aspecto importante, observado durante a execução desta Tese, consistiu em ter-se disponível uma área de trabalho dedicada, controlada, quer em aspectos operacionais, quer nos aspectos de higiene laboratorial. Com isso, e considerando-se que todo o processo de produção levou cerca de dois anos, envolvendo cerca de mil mensurações, reduziu-se significativamente a probabilidade de que fatores externos ao desenvolvimento do material pudessem afetar sua qualidade final.

Dessa forma, os objetivos propostos neste trabalho foram amplamente alcançados.

Os resultados apresentados, principalmente quanto aos estudos de homogeneidade e estabilidade, pelo laboratório produtor do material de referência, evidenciam que todas as atividades realizadas, incluindo desde o planejamento das etapas, o recebimento, preparação dos indivíduos de peixe até a realização das análises, foram desempenhadas conforme as normas vigentes.

A manutenção de um gráfico de controle foi fundamental para o acompanhamento de todo o processo. O gráfico de controle contendo os valores obtidos

para o material de referência Dorm-2, analisado por meio da técnica FIA-CV-AAS, durante a realização do trabalho, apresentado no apêndice C, permitiu demonstrar que o processo de medição permaneceu sob controle, pois os valores se mantiveram entre os limites inferior e superior estabelecidos.

A avaliação da robustez, realizada com a análise de outros materiais de referência certificados (BCR 463 – Total and Methyl Mercury in Tuna fish, BCR, Bélgica e Dolt-2 – Dogfish Liver Certified Reference Materials for Trace Metals, NRCC, Canadá), tendo concentrações diferentes dos analitos, contribuiu para o processo de validação das metodologias empregadas, principalmente para metilmercúrio.

O critério do erro normalizado para os dois analitos foi satisfeito, demonstrando que, principalmente para metilmercúrio, a metodologia está definida e pode ser utilizada na rotina do laboratório. A metodologia para mercúrio total, já é amplamente utilizada nas dependências do laboratório, sendo este método acreditado no INMETRO.

A ferramenta estatística, proposta por Fearn e Thompson<sup>34</sup>, para provar a homogeneidade do material, demonstrou ser aplicável e uma alternativa quando o método analítico utilizado nas medições apresentar uma repetitividade não satisfatória.

O valor obtido para incerteza de medição associado ao teste de homogeneidade para mercúrio total, correspondeu a aproximadamente 1 %, enquanto que para metilmercúrio este valor correspondeu a 2 %. Isso considerando os valores de concentração, para esses analitos, obtidos por meio da técnica FIA-CV-AAS.

O estudo da massa mínima demonstrou que no intervalo de massa de 0,200 g a 0,800 g os desvios padrão foram praticamente iguais, demonstrando que houve repetitividade para a menor porção de massa testada e para a maior porção. Por conveniência, optou-se por realizar as medições na massa de 0,400 g, uma vez que esta fornece uma concentração adequada de mercúrio a ser medido, nas técnicas analíticas utilizadas, e não oferece qualquer restrição quanto a sólidos dissolvidos para as mesmas. Cabe ressaltar que, segundo a norma ABNT ISO Guia 33, convém que o usuário esteja ciente de que a utilização de uma porção de ensaio que não atenda ou que exceda aquela especificação pode aumentar significativamente a contribuição da não homogeneidade do MRC para a incerteza da propriedade certificada, até o ponto em que os parâmetros estatísticos da certificação não são mais válidos.

O estudo de estabilidade do material demonstrou que para mercúrio total e metilmercúrio, nas três temperaturas testadas, os resultados não variaram mais do que 10%. Isso indica que o material desde a temperatura de geladeira até 40 °C, não sofre alteração. Os valores das incertezas para o teste de estabilidade, considerando as concentrações obtidas por meio da técnica FIA-CV-AAS, apresentaram um percentual igual a 10% para mercúrio total e 6% para metilmercúrio. Esses valores obtidos de incerteza associada à estabilidade contribuíram de forma significativa para a incerteza expandida dos analitos, principalmente para mercúrio total que correspondeu aproximadamente a metade dos 21% obtidos na incerteza final. A variabilidade dos resultados pode estar associada ao fato que, na preparação do candidato a material de referência, a etapa de extração de gordura não foi realizada conforme sugere o fluxograma existente no certificado do material de referência Dorm-2, produzido por NRCC, Canadá. Uma hipótese levantada ao final deste trabalho é que a presença de gordura pode ter criado pequenos aglomerados, invisíveis a inspeção visual, influenciando de alguma forma na homogeneidade do material. Importante notar que a eliminação dessa etapa não foi tomada de maneira aleatória. O Laboratório de Caracterização Química tem implantado uma rotina em análises de mercúrio em pescado (atuando em projetos de pesquisa e atendendo a clientes externos). Como resultado dessa experiência, observa-se que, dentro do protocolo analítico implantado, quando o indivíduo em análise possui teores consideráveis de gordura, forma-se nos balões, uma nítida camada desse material durante o processo de digestão. Considerando ser a Dourada um peixe carnívoro, normalmente com baixos teores de gordura, e a solução resultante da digestão de seu tecido (in natura) não apresentar indícios de gordura, desprezou-se essa etapa no processo de produção.

Outro aspecto observado durante a execução desse trabalho, está relacionado a influência da técnica analítica utilizada no controle do processo (FIA-CV-AAS) na incerteza final dos valores certificados para o material.

No LCQ, a técnica FIA-CV-AAS para Hg total está acreditada com cerca de 12% de incerteza. Esse valor contribuiu de forma significativa na incerteza final do material. Dessa forma, uma melhoria no processo seria utilizar a técnica de diluição isotópica aplicada à espectrometria de massas (IDMS), cuja incerteza global é de até 2%.

Os valores obtidos das concentrações para mercúrio e metilmercúrio, por meio de duas diferentes técnicas analíticas, foram comparados, oferecendo assim, uma inovação para os resultados apresentados e permitiu também a conclusão que um método primário deve ser utilizado, em todas as etapas de caracterização do material, para diminuir a contribuição de incerteza expandida no resultado final.

O método primário utilizado neste trabalho, para a caracterização do material, demonstrou ser uma técnica precisa e extremamente sensível. Apesar de reconhecidamente exigir procedimentos muito bem planejados, principalmente quanto a preparação das soluções padrão, traçadores dos elementos e das soluções mistura (amostra + traçador), seus resultados apresentaram razões isotópicas com desvios de até 1,4% o que está de acordo com a literatura. A adição dos traçadores de mercúrio e chumbo realizada simultaneamente nas amostras contribuiu de maneira efetiva para diminuição do tempo de preparo e obtenção dos resultados. Pelos resultados obtidos para metilmercúrio, verificou-se que a estratégia utilizada adicionando um traçador de mercúrio após o tratamento executado nas amostras, é eficaz sem necessidade de aplicação do específico traçador de metilmercúrio, como é citado na literatura. A metodologia utilizada neste trabalho traz uma inovação no procedimento analítico realizado.

Na avaliação dos resultados obtidos na técnica de diluição isotópica, confirmou-se que existe um compromisso importante entre a resposta do sinal analítico para o isótopo selecionado e a mesma resposta no branco. Quanto maior a relação sinal/ruído (branco) mais precisa e exata é a medida. Outro importante fator na técnica, na etapa de calibração do traçador, é o compromisso com a razão da mistura padrão e traçador e razão do padrão natural do analito a ser determinado. Isso porque na equação utilizada para o cálculo da calibração do traçador há uma subtração da razão mistura e razão padrão, se essas forem muito próximas ou iguais, a subtração se anula e o cálculo fica prejudicado.

Os resultados obtidos nos materiais de referência certificados, analisados concomitantemente com as amostras, por meio de diluição isotópica, demonstraram que a técnica foi realizada corretamente e esses resultados estão comparáveis aos informados nos certificados dos materiais. Os valores de incerteza expandida obtidos no trabalho, quando comparados com aqueles dos certificados, estão menores, esse fato era esperado, uma vez que, aquele valor do certificado é um valor médio obtido com

utilização de variadas técnicas, enquanto que o obtido neste trabalho é referente a determinação por um único método primário. O material produzido apresentou uma incerteza expandida de cerca de 20% para os analitos certificados (Hg total e MeHg). Este valor poderá ser aprimorado em um processo de recertificação e a partir dos dados obtidos com futuros usuários do material.

Importante notar que a produção do material obtido neste trabalho não é um fim. Ao contrário, é o início de um processo no qual a experiência acumulada irá contribuir de maneira fundamental nos novos desafios que desenham-se no futuro.

## **APÊNDICE A – Resumo do relatório de validação do ensaio Determinação de mercúrio total em amostra de peixe por meio da técnica FIA-CV-AAS.**

### **Características de desempenho do método – Teoria**

As características de desempenho do método (ou parâmetros de validação) que foram realizadas para o ensaio são:

- Limite de detecção
- Exatidão
- Precisão
- Repetitividade
- Linearidade
- Incerteza de medição

A seguir, define-se cada parâmetro utilizado na validação e no final, são mostrados os resultados obtidos.

### **Limite de Detecção**

É definido como sendo o menor valor de concentração do analito ou da propriedade que pode ser detectado pelo método.

Para a validação de um método analítico, é normalmente suficiente fornecer uma indicação do nível em que a detecção do analito começa a ficar problemática, ou seja, “branco + 3s” e “0 + 3s”, considerando a análise de sete ou mais amostras de branco e, se necessário, de brancos com adição, respectivamente. O símbolo “s” significa desvio padrão.

As condições laboratoriais recomendadas, pelo documento DOQ-CGCRE-008, para se obter o limite de detecção (LD) são de se analisar sete (7) ou mais soluções branco.

### **Exatidão**

É a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como verdadeiro. A exatidão, quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, implica numa combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos (tendência).

Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são, entre outros, o uso de materiais de referência, a participação em comparações interlaboratoriais e a realização de ensaios de recuperação.

Caso o laboratório calcule a incerteza do seu resultado, o valor verdadeiro deve estar dentro do valor de incerteza. Quando isso não acontece, esse intervalo pode estar subestimado. Nesses casos é empregado o conceito de erro normalizado ( $E_n$ ), para avaliar o desempenho, conforme equação abaixo:

$$E_n = \frac{|X_{lab} - X_v|}{\sqrt{U_{lab}^2 + U_{ref}^2}}$$

Onde:  $X_{lab}$  = valor obtido pelo laboratório,  $X_v$  = valor aceito como verdadeiro,  $U_{lab}$  = incerteza associada ao valor do laboratório e  $U_{ref}$  = incerteza associada ao valor verdadeiro.

### **Precisão**

Precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. As duas formas mais comuns de expressá-la são por meio da repetitividade e a reprodutibilidade, sendo usualmente expressa pelo desvio padrão.

A repetitividade e a reprodutibilidade são geralmente dependentes da concentração do analito e, deste modo, devem ser determinadas para um diferente número de concentrações e, em casos relevantes, a relação entre precisão e a concentração do analito deve ser estabelecida.

### **Linearidade**

É a habilidade de um método em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de concentração. A linearidade é obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real.

A equação da reta que relaciona as duas variáveis é:

$$y = ax + b$$

Onde:

y = Resposta medida (absorbância, altura ou área do pico, etc)

x = Concentração

a = Inclinação da curva de calibração = sensibilidade

b = Interseção com o eixo y, quando  $x = 0$

A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito ou então calculados a partir da equação de regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados.

O coeficiente de correlação linear ( $r$ ) é freqüentemente usado para indicar o quanto pode ser considerada adequada a reta como modelo matemático. Um valor maior que 0,90 é, usualmente requerido. O método pode ser considerado como livre de tendências (unbiased) se o corredor de confiança da reta de regressão linear contiver a origem.

### **Incerteza de Medição**

O resultado de uma medição é apenas uma aproximação ou estimativa do valor do mensurando. Sendo assim, a representação completa desse mensurando deve incluir a incerteza de medição.

A palavra “incerteza” significa dúvida e assim, no sentido mais amplo, “incerteza de medição” significa dúvida sobre a qualidade do resultado de uma medição. A definição formal do termo incerteza de medição segundo o VIM é “parâmetro associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser razoavelmente atribuídos ao mensurando”.

A incerteza de medição da concentração de um analito em uma determinada matriz, por exemplo, é expressa na forma de desvio padrão, chamada de incerteza padrão. Entretanto, a incerteza total do método proposto é a soma de todas as incertezas geradas em cada passo do método pelos diversos componentes do processo de medição. Um experimento bem planejado pode, em muito, facilitar as avaliações confiáveis da incerteza e é um requisito importante na organização das atividades de medição.

Com o objetivo de identificar e analisar as possíveis fontes de incerteza na metodologia proposta, os procedimentos adotados, para cada etapa, foram detalhados e estruturados de forma a garantir a abrangência necessária para o entendimento e conhecimento do processo de medição e evitar a duplicidade de fontes de incerteza.

### **Testes adicionais**

Alguns ensaios adicionais foram realizados com o objetivo de reforçar a validação da metodologia, propondo assim um aumento das características de desempenho do método. Uma dessas características, a ser amplamente implementada é a robustez do método de ensaio, que mede a sensibilidade que este apresenta em face de pequenas variações. Um método diz-se robusto se revelar praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando esse está sendo executado.

Dessa forma, algumas variações no método foram testadas como fluxo do gás, temperatura de digestão da amostra e massa inicial de amostra.

### **Conclusões**

Verificações precisam ser realizadas a fim de assegurar que as características de desempenho de um método analítico desenvolvido em um laboratório sejam entendidas e que demonstrem que esse método é cientificamente coerente nas condições em que ele pode ser aplicado. Essas verificações são coletivamente conhecidas como validação.

A validação, portanto, estabelece através de estudos sistemáticos no laboratório, que o método é adequado à finalidade proposta e que seus resultados são amplamente empregados a fim de atender as necessidades de um problema analítico.

Não existe um acordo unânime sobre todas as características a serem estudadas em uma validação de método. Porém, vários documentos existentes na literatura indicam as características que contribuem para confirmar a adequação do método analítico. Neste processo de validação as características limite de detecção, exatidão, precisão, linearidade, incerteza de medição e outros testes adicionais foram utilizados para demonstrar a aplicabilidade da metodologia.

Diante das características estudadas e os resultados obtidos e documentados, conforme resumo abaixo, o laboratório conclui que o método desenvolvido preenche inteiramente as suas necessidades.

### RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS

CARACTERÍSTICA	VALOR OBTIDO
Limite de detecção	2 a 3 $\mu\text{g Kg}^{-1}$
Exatidão	Erro normalizado < 1
Precisão	Para uma concentração de 5 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ a precisão é aproximadamente 5%, enquanto que, quando a concentração aumenta para 10 e 20 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ a precisão apresenta um valor de aproximadamente 2%.
Linearidade	Adequada
Incerteza de medição	O valor médio obtido na incerteza expandida, com $k=2$ e 95% de confiança, corresponde a um valor máximo de 10% no resultado da medição.
Testes adicionais: Fluxo de gás	0.16 a 0.2 litros $\text{min}^{-1}$
Testes adicionais: Temperatura de digestão	100 °C aproximadamente
Testes adicionais: Massa inicial da amostra	0,4 g

**APÊNDICE B – Modelo de planilha utilizada para cálculo do analito mercúrio para determinar a massa de amostra e massa de traçador necessárias para compor a mistura (amostra + traçador).**

Microsoft Excel - Diluição isotópica para Hg

Arquivo Editar Exibir Inserir Formatar Ferramentas Dados Janela RéExcel Ajuda Digite uma pergunta

1 **DILUIÇÃO ISOTÓPICA**

2

3

4 
$$C_s = C_{sp} \cdot \frac{W_{sp}}{W_s} \cdot \frac{A_{r_s}}{A_{r_{sp}}} \cdot \frac{A_{s_{sp}}}{A_{s_s}} \cdot \frac{R_m - R_{sp}}{1 - R_m \cdot R_s}$$

5

6

7

8

9  $C_s$  = Concentração desconhecida do elemento na amostra = 0.3 ug/g (ppm)

10  $C_{sp}$  = concentração do elemento no traçador (spike - sp) = 0.13003 ug/g (ppm)

11  $W_{sp}$  = massa do traçador (spike - sp) = g

12  $W_s$  = massa da amostra = 0.4 g

13  $A_{r_s}$  = Massa atômica da amostra = 199.96831 200

14  $A_{r_{sp}}$  = Massa atômica do traçador (spike - sp) = 201.97063 202

15  $A_{s_{sp}}$  = Abundância (at%) do isótopo enriquecido no traçador (spike) = 97.6859 202

16  $A_{s_s}$  = Abundância (at%) do isótopo na amostra = 23.073 200

17  $R_m$  = Razão isotópica na mistura = 0.55 200/202

18  $R_{sp}$  = Razão isotópica no traçador (spike - sp) = 0.005499 200/202

19  $R_s$  = Razão isotópica na amostra = 1.29779 202/200

20

21  $Z = 7.97455235$

22  $Z \cdot C_{sp} = 1.03693104$

23  $\frac{R_m - R_{sp}}{1 - R_m \cdot R_s} = 1.9024162$

24  $C_s = C_{sp} \cdot \frac{W_{sp}}{W_s} \cdot Z \Rightarrow \frac{W_s \cdot C_s}{C_{sp} \cdot Z} = W_{sp}$

25

26

27  $W_{sp} = 0.11573$  g

28

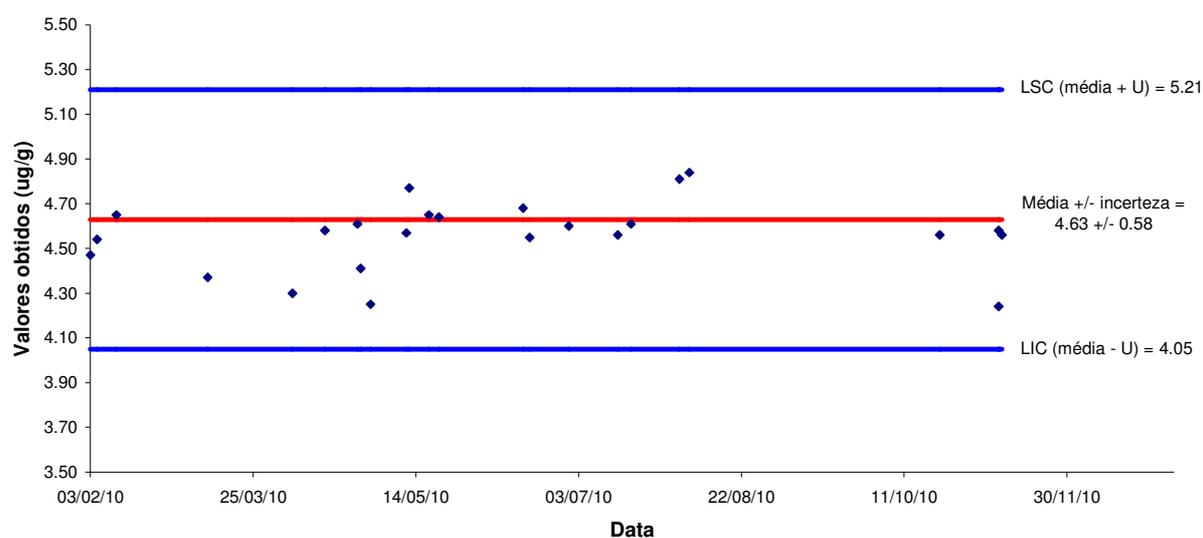
Pronto

APÊNDICE C – Gráfico de controle dos resultados obtidos, para Hg total, do material de referência Dorm-2, no período de 2010.

### GRÁFICO DE CONTROLE - MATERIAL DE REFERÊNCIA DORM-2 (Dogfish Muscle)

Período: Janeiro a Dezembro/2010

Obs.: Os valores calculados dos limites são relativos ao valor médio obtido da incerteza expandida (0.58), correspondendo a 12.5%.

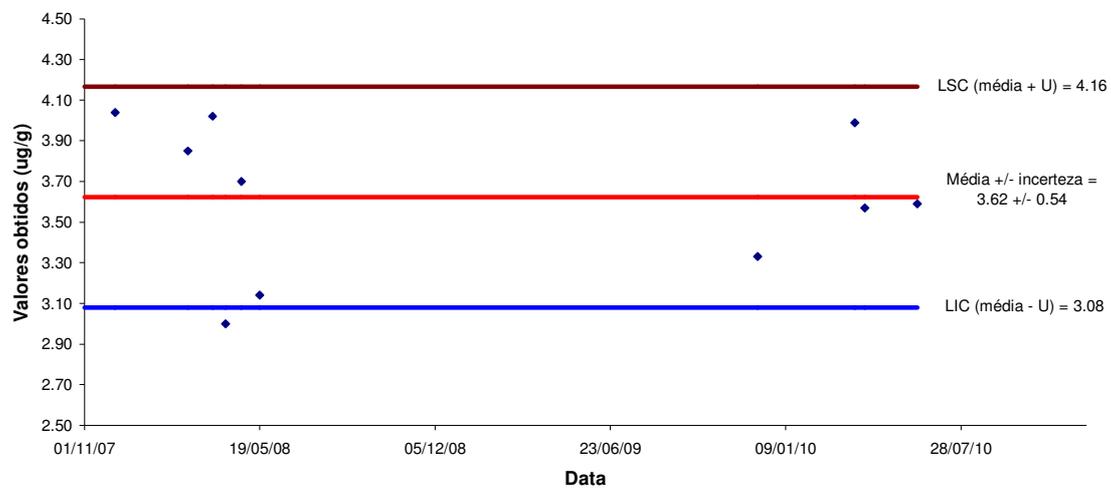


APÊNDICE D – Gráfico de controle dos resultados obtidos, para MeHg, do material de referência Dorm-2, no período de 2007 a 2010.

**GRÁFICO DE CONTROLE - MATERIAL DE REFERÊNCIA DORM-2  
(Dogfish Muscle)**

**Período: Dezembro/2007 a Dezembro/2010**

Obs.: Os valores calculados dos limites são relativos ao valor médio obtido da incerteza expandida (0.54), correspondendo a 15%.



## ANEXO A – Descrição dos testes de Grubs e de Dixon

### Teste de Grubs – Descrição

É um teste muito parecido com o teste de Dixon, porém a média dos resultados e o desvio padrão experimental são considerados na análise dos dados, exigindo, portanto, cálculos mais trabalhosos, embora a metodologia seja simples.

Dado um conjunto de resultados, os valores devem ser ordenados preferencialmente na ordem crescente. Em seguida, o valor médio e o desvio padrão devem ser calculados.

Neste teste os seguintes parâmetros são calculados:

Para testar o maior valor:  $G_1 = \frac{ \bar{x} - x_i }{s}$	Para testar o menor valor:  $G_2 = \frac{\bar{x} - x_1}{s}$
Para testar os dois maiores valores:  $G_3 = \frac{S_{p-1,p}}{S_o^2}$	Para testar os dois menores valores:  $G_3 = \frac{S_{1,2}}{S_o^2}$

Onde:  $\bar{x}$  é o valor médio calculado dos valores;  $x_i$  é o maior valor do conjunto;  $s$  é o desvio padrão dos valores;  $x_1$  é o menor valor do conjunto (primeiro valor da série crescente);  $S_{p-1,p}$  é a diferença quadrática (soma de cada valor menos média ao quadrado) excluindo-se os dois maiores valores do conjunto, tanto na média como na soma;  $S_{1,2}$  é a diferença quadrática (soma de cada valor menos média ao quadrado) excluindo-se os dois menores valores do conjunto, tanto na média como na soma e finalmente  $S_o^2$  é a diferença quadrática com todos os valores do conjunto.

A etapa seguinte consiste em localizar na tabela específica os valores de  $G_1$ ,  $G_2$  e  $G_3$  considerando nível de confiança iguais a 95 e 99% e o número de dados existentes ( $n$ ).

O critério a ser considerado é se  $G_1$ ,  $G_2$  e  $G_3$  calculado  $\leq G_1$ ,  $G_2$  e  $G_3$  crítico, o valor testado não é outlier (rejeitado).

**Teste de Dixon – Descrição**

É um teste bilateral. São testados os valores mínimo e máximo.

Dado um conjunto de resultados  $Z(h)$ ,  $h=1,2,\dots,H$ , agrupados em ordem crescente, o teste de Dixon (D) utiliza o seguinte critério:

$$3 \text{ a } 7 \quad D_{\text{Calculado}} = \frac{Z(2) - Z(1)}{Z(H) - Z(1)} \text{ e } \frac{Z(H) - Z(H-1)}{Z(H) - Z(1)}$$

$$8 \text{ a } 12 \quad D_{\text{Calculado}} = \frac{Z(2) - Z(1)}{Z(H-1) - Z(1)} \text{ e } \frac{Z(H) - Z(H-1)}{Z(H) - Z(2)}$$

$$13 \text{ a } 40 \quad D_{\text{Calculado}} = \frac{Z(3) - Z(1)}{Z(H-2) - Z(1)} \text{ e } \frac{Z(H) - Z(H-2)}{Z(H) - Z(3)}$$

Os valores críticos deste teste encontram-se tabelados:

$D_{\text{calculado}} < D_{\text{tabelado } 5\%} = \text{valor aceito}$
$D_{\text{tabelado } 1\%} > D_{\text{calculado}} > D_{\text{tabelado } 5\%} = \text{valor suspeito}$
$D_{\text{calculado}} > D_{\text{tabelado } 1\%} = \text{valor disperso}$

**ANEXO B – Certificado de acreditação do Laboratório de Caracterização Química.**

República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior  
Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial - Inmetro

**Coordenação Geral de Acreditação**

Signatário dos Acordos de Reconhecimento Mútuo da International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC),  
da Interamerican Accreditation Cooperation (IAAC) e do  
Acordo Bilateral de Reconhecimento Mútuo com a European Co-operation for Accreditation (EA)

**Certificado de Acreditação**  
Acreditação nº CRL 0242

Acreditação inicial: 18-01-2007

LABORATÓRIO DE CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA  
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES  
AV. PROF. LINEU PRESTES, 2.242 – CIDADE UNIVERSITÁRIA – PINHEIROS  
SÃO PAULO – SP

*A Coordenação Geral de Acreditação do Inmetro – Cgcre/Inmetro – concede acreditação ao Laboratório acima identificado, segundo os requisitos estabelecidos na ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005. Esta acreditação constitui a expressão formal do reconhecimento da sua competência para realizar os ensaios constantes no Escopo de Acreditação.*

Aldeney Freixo Costa  
Coordenador Geral de Acreditação Substituto

Emissão: 15-01-2009

Validade: 18-01-2011

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Vocabulário Internacional de Metrologia: conceitos fundamentais e gerais e termos associados (VIM 2008)**. 1. edição Brasileira, 78p., Rio de Janeiro, 2009.
- 2 MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Instrução Normativa Nº 1, de 16 de janeiro de 2007**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/portal/page/portal/Internet-MAPA/pagina-inicial/animal/laboratorios/legislacao>>. Acesso em: 14 de fev. 2011.
- 3 INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Acreditação de laboratórios (ABNT NBR iso/iec 17025:2005)**. Disponível em: <[http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/acre\\_lab.asp](http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/acre_lab.asp)>. Acesso em: 14 fev. 2011.
- 4 ROPER, P.; BURKE, S.; LAWN, R.; BARWICK, V.; WALKER, R. **Applications of Reference Materials in Analytical Chemistry**. Cambridge, UK.: Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, 2001.
- 5 INSTITUTO DE PESOS E MEDIDAS DO ESTADO DE SÃO PAULO, **Padrão Primário, definição**. Disponível em: <<http://www.ipem.sp.gov.br/5mt/met-geral.asp?vpro=padrao>>. Acesso em: 10 fev. 2011.
- 6 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Termos e definições relacionados com materiais de referência**. Rio de Janeiro: ABNT, 2000. (ISO GUIA 30).
- 7 COMAR - International database for certified reference materials. Disponível em: <<http://www.comar.bam.de/en/>>. Acesso em: 24 ago. 2010.
- 8 SHARPLESS, K.E.; COLBERT, J.C.; GREENBERG, R.R.; SCHANTZ, M.M.; WELCH, M.J. Recent Developments in food-matrix Reference Materials at NIST. **Fresenius J. Anal. Chem.** 370, p. 275-278, 2001.
- 9 GUILLEBON, B.; PANNIER, F.; SEBY; F. QUEVAUVILLER, D.B. Production and use of reference materials for environmental analyses: conclusions of a workshop. **Trends in analytical chemistry**, v. 20, n. 3, 2001.
- 10 DUTA, S. Production and certification of environmental reference materials in Romania. **Fresenius J. Anal. Chem.** 360, p. 296-298, 1998.

- 11 QUEVAUVILLER, P.; DRBAEK, I.; MUNTAU, H.; BIANCHI, M.; BORTOLI, A.; GRIEPINK, B. Certified reference materials (CRMs 463 and 464) for the quality control of total and methyl mercury determination in tuna fish. **Trends in analytical chemistry**, v. 15, n. 5, 1996.
- 12 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Requisitos gerais para competência de produtores de material de referência**. Rio de Janeiro: ABNT, 2004. (ISO GUIA 34).
- 13 INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Reference Materials -General and statistical principles for certification**. 3<sup>o</sup> edition, 2006. (ISO GUIDE 35).
- 14 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração**. Rio de Janeiro: ABNT, 2005. (NBR ISO/IEC 17025).
- 15 COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS. **Teores máximos de certos contaminantes presentes nos gêneros alimentícios**. Regulamento (CE) N<sup>o</sup> 1881/2006. Disponível em: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2006R1881:20080723:PT:PDF>. Acesso em 24/08/2010.
- 16 MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria N<sup>o</sup> 685, de 27 de agosto de 1998.
- 17 2<sup>a</sup> CONFERÊNCIA NACIONAL DE AQUICULTURA E PESCA, RESOLUÇÕES. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/mpa/seap/2conferencia/Resolucoes/Resolucao.pdf>. Acesso em 01 fev. 2011.
- 18 MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. Produção Pesqueira e Aquícola – estatística 2008 e 2009. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/mpa/seap/Jonathan/mpa3/dados/2010/Docs/Caderno%20Consolidação%20dos%20dados%20estatísticos%20final%20curvas%20-%20completo.pdf>. Acesso em: 24 ago. 2010.
- 19 Secretaria de Comércio Exterior, Ministério do Desenvolvimento. Indústria e Comércio Exterior, Estatísticas de comércio exterior – DEPLA, [Balança comercial brasileira: mensal](#) 2010. Disponível em: [http://www.desenvolvimento.gov.br/arquivos/dwnl\\_1292515977.doc](http://www.desenvolvimento.gov.br/arquivos/dwnl_1292515977.doc). Acesso em: 18 jan. 2011.
- 20 Aprendendo a exportar pescado - Secretaria de Comércio Exterior - SECEX do [Ministério do Desenvolvimento Indústria e Comércio Exterior - MDIC](#). Disponível em: <http://www2.desenvolvimento.gov.br/pescados/sitio/como-exportar/como-exportar-pescados/index.php>. Acesso em 31 jan. 2011.

- 21 RASBERRY, S.D. Standard Reference Materials – The First Century. Gaithersburg, Jan. 2003. (NIST Special Publication 260-150).
- 22 NIST, Standard Reference Materials Catalog, catálogo. Disponível em: <<http://www.nist.gov/ts/msd/srm/upload/SRM-Catalog-2010-Final.pdf>>. Acesso em 03 set. 2010.
- 23 IRMM, Certified Reference Materials 2010, catálogo. Disponível em: <[http://irmm.jrc.ec.europa.eu/html/reference\\_materials\\_catalogue/catalogue/RM\\_Catalogue.pdf](http://irmm.jrc.ec.europa.eu/html/reference_materials_catalogue/catalogue/RM_Catalogue.pdf)>. Acesso em 03 set. 2010.
- 24 Materiais de Referência, catálogo. Instituto de Pesquisas Tecnológicas. Disponível em: <[http://www.ipt.br/materiais\\_de\\_referencia](http://www.ipt.br/materiais_de_referencia)>. Acesso em: 02 set. 2010.
- 25 Materiais de Referência Certificados, lista. Centro de Tecnologia Mineral. Disponível em: <[http://www.cetem.gov.br/mrc/mrcs\\_disponiveis.htm](http://www.cetem.gov.br/mrc/mrcs_disponiveis.htm)>. Acesso em: 02 set. 2010.
- 26 Materiais de referência. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS). Disponível em: <http://www.fiocruz.br/incqs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=29>. Acesso em: 02 set. 2010.
- 27 Materiais de Referência Certificados em disponibilidade. INMETRO. Disponível em: <[http://www.inmetro.gov.br/metcientifica/mat\\_ref\\_cert.asp](http://www.inmetro.gov.br/metcientifica/mat_ref_cert.asp)>. Acesso em: 02 set. 2010.
- 28 OLIVEIRA JUNIOR, O.P. **Preparação, caracterização e certificação de materiais de referência isotópicos de urânio**. 2006. Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Energeticas e Nucleares, Sao Paulo.
- 29 MOREIRA, E.G. **Preparo e certificação de um material de referência de mexilhão (perna perna)**. 2010. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
- 30 LIMA, D.C **Aplicação de técnicas de análise multivariada na caracterização de parâmetros avaliados durante o desenvolvimento de material de referência certificação de amostra de farinha de trigo para análise inorgânica**. 2009. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Salvador.
- 31 LIMA, A.A.G. **Estudo do desenvolvimento de um material de referência para o controle de qualidade do mel de Apis mellifera L.**. 2008. Tese (Doutorado) - Universidade Federal da Bahia, Salvador.
- 32 Biblioteca virtual da FAPESP. Disponível em: <<http://www.bv.fapesp.br/pesquisa/index.php?lang=pt&col=main&site=fapesp&count=10&filter=&filterLabel=&pageFrom=11&from=&addfilter=&backfilter=&printMode=&output=&fb=&q=%20Bid%3A%28%22regulares-2908%22+OR+%22jp-4692%22%29&index=&sort=RELEVANCE>>. Acesso em: 24 ago. 2010.

- 33 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Materiais de referência – conteúdo de certificados e rótulos**. Rio de Janeiro: ABNT, 2004. (ISO GUIA 31).
- 34 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Calibração em química analítica e uso de materiais de referência certificados**. Rio de Janeiro: ABNT, 2000. (ISO GUIA 32).
- 35 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Utilização de materiais de referência certificados**. Rio de Janeiro: ABNT, 2002. (ISO GUIA 33).
- 36 VAN DER VEEN, A. M. H., PAUWELS, J. Uncertainty calculations in the certification of reference materials. 1. Principles of analysis of variance. **Accred. Qual. Assur.**, v. 5, n. 12, p. 464-469, 2000.
- 37 FEARN, T.; THOMPSON, M. A new test for “sufficient homogeneity”. **Analyst**, n. 126, p. 1414-1417, 2001.
- 38 THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories. **Pure Appl. Chem.**, v. 78, n. 1, p. 145–196, 2006.
- 39 COTTA, A. J.B. Estudo da homogeneidade e atribuição de valores e incertezas certificados a um material de referência de basalto ((BRP-1) basalto de Ribeirão Preto). 2007. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Geociências, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- 40 INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Guia para a Expressão da Incerteza de Medição**. 3<sup>a</sup> edição brasileira, Rio de Janeiro, 2003.
- 41 EURACHEM/CITAC Guide. **Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement**. 2. Edition, 2000.
- 42 VAN DER VEEN, A. M.H.; LINSINGER, T.; PAUWELS, J. Uncertainty calculations in the certification of reference materials. 2. Homogeneity study. **Accred. Qual. Assur.** v. 6, n. 1, p. 26-30, 2001.
- 43 VAN DER VEEN, A. M. H.; LINSINGER, T.P.J.; LAMBERTY, A.; PAUWELS, J. Uncertainty calculations in the certification of reference materials. 3. Stability study. **Accred. Qual. Assur.**, v. 6, n. 6, p. 257-263, 2001.
- 44 LIMA, A.P.S.; SARKIS, J.E.S.; SHIHOMATSU, H.M.; MÜLLER, R.C.S. Mercury and selenium concentrations in fish samples from Cachoeira do Piriá Municipality, Pará State, Brazil. **Environmental Research**, v. 97, p. 236-244, 2005.

- 45 GUIMARÃES, J.R.D.; MALM, O.; PFEIFFER, W.C. A simplified radiochemical technique for measurements of net mercury methylation rates in aquatic systems near goldmining areas, Amazon, Brazil. **The Science of the Total Environment**, v. 175, p. 151-162, 1995.
- 46 SANTOS, L.S.N.; MÜLLER, R.C.S.; SARKIS, J.E.S.; ALVES, C.N.; BRABO, E.S.; SANTOS, E.O.; BENTES, M.H.S. Evaluation of total mercury concentrations in fish consumed in the municipality of Itaituba, Tapajós River Basin, Pará, Brazil. **The Science of the Total Environment**, v. 261, p. 1-8, 2000.
- 47 AZEVEDO, F.A. **Toxicologia do mercúrio**. São Paulo, SP: RiMa, Intertox, 2003. cap.6, toxicocinética. p. 115-131.
- 48 WALSH, A. The application of atomic absorption spectra to chemical analysis. **Spectrochimica Acta**, v. 7, p. 108-117, 1955.
- 49 SNEDDON, J., FARAH, B.D., FARAH, K.S. Multielement Atomic Absorption Spectrometry: A historical Perspective. **Microchemical Journal**, v. 48, p. 318-325, 1993.
- 50 AKAGI, H., MALM, O., BRANCHES, F.J.P., KINJO, Y., KASHIMA, Y., GUIMARAES, J.R.D., OLIVEIRA, R.B., HARAGUCHI, K., PFEIFFER, W.C., TAKIZAWA, Y., KATO, H. Human exposure to mercury due to goldmining in the Tapajós river basin, Amazon, Brazil: speciation of mercury in human hair, blood and urine. **Water, Air, and Soil Pollution**, n. 80, p. 85-94, 1995.
- 51 HORTELLANI, M.A. Avaliação da contaminação por mercúrio dos sedimentos do estuário Santos - São Vicente, no período de 1996-2000. 2003. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
- 52 HORVAT, M., MAY, K., STOEPLER, M., BYRNE, A.R. Comparative studies of methylmercury determination in biological and environmental samples. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 2, p. 515-524, 1988.
- 53 MAY, K., STOEPLER, M., REISINGER, K. Studies in the ratio total mercury methylmercury in the aquatic food chain. In: MERIAN, E., FREI, R.W., HARDI, W., SCHLATTER, CH. (Ed.). **Carcinogenic and mutagenic metal compounds 2**, 1988.
- 54 VOGL, J. Characterisation of reference materials by isotope dilution mass spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 22, p. 475-492, 2007.
- 55 GARCIA ALONSO, J.I. Determination of fission products and actinides by inductively coupled plasma-mass spectrometry using isotope dilution analysis: a study of random and systematic errors. **Analytica Chimica Acta**, v. 312, p. 57-78, 1995.
- 56 HEUMANN, K.G.; GALLUS, S.M.; RADLINGER, G.; VOGL, J. Precision and accuracy in isotope ratio measurement by plasma source mass spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 13, p. 1001-1008, September, 1998.

- 57 MOORE, L.J.; MACHLAN, L.A.; SHIELDS, W.R.; GARNER, E.L. Internal normalization techniques for high accuracy isotope dilution analysis. Application to molybdenum and nickel in standard reference material. **Anal. Chem.**, v. 46, n. 8, 1974.
- 58 MICHIELS, E.; DE BIEVRE, P. Accurate assay of lithium by isotope dilution mass spectrometry. **Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.**, v. 48, p. 369-72, 1983.
- 59 KIPPHARDT, H., VALKIERS, S., TAYLOR, P.D.P., DE BIÉVRE, P. "Calibration" in isotopic measurements. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 198, p. 71-76, 2000.
- 60 MORAES, N.M.P. **Aplicação e avaliação da técnica de diluição isotópica por espectrometria de massa na determinação de elementos de terras-raras em material geológico**. 1988. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
- 61 PAPADAKIS, I. ; QUÉTEL, C.R., TAYLOR, P.D.P. , DE BIÉVRE, P. Contribution to the certification of cadmium and lead amount content in the BCR CRM-278R mussel tissue by isotope dilution mass spectrometry. **Accred Qual Assur**, n. 5, p. 198–204, 2000.
- 62 JOCHEN VOGL, J.; QUÉTEL, C.R.; OSTERMANN, M.; PAPADAKIS, I.; VAN NEVEL, L.; TAYLOR, P.D.P. Contribution to the certification of B, Cd, Mg, Pb, Rb, Sr, and U in a natural water sample for the International Measurement Evaluation Programme Round 9 (IMEP-9) using ID-ICP-MS. **Accred Qual Assur**, n. 5, p. 272-279, 2000.
- 63 VOGL, J.; LIESEGANG, D.; OSTERMANN, M.; DIEMER, J.; BERGLUND, M.; QUÉTEL, C.R.; TAYLOR, P.D.P.; HEUMANN, K.G. Producing SI-traceable reference values for Cd, Cr and Pb amount contents in polyethylene samples from the Polymer Elemental Reference Material (PERM) project using isotope dilution mass spectrometry. **Accred Qual Assur**, n. 5, p. 314-324, 2000.
- 64 IBAMA-MMA. Estatística da Pesca – 2004 – Brasil Grandes Regiões e Unidades da Federação, Brasília, 2005. Disponível em: [http://www.mpa.gov.br/mpa/seap/Jonathan/mpa3/info-estatistica-2004.pdf](http://www.mpa.gov.br/mpa/seap/Jonathan/mpa3/info-estatistica/docs/estatistica-2004.pdf). Acesso em: 10 out. 2010.
- 65 ECOMAR – Indústria de pesca, sediada em Vigia – Pará. Rua 5 de agosto, 10. Disponível em: <http://www.ecomar.com.br/apresentacao.asp>. Acesso em: 15 fev. 2011.
- 66 FIDÉLIS, G.C. Guia prático-Estatística aplicada nas calibrações, medições e ensaios. Centro de Educação, Consultoria e Treinamento em metrologia (CECT), Florianópolis, SC, 2010.
- 67 OLIVIERI, J.C. Programas interlaboratoriais – determinação da precisão de metodologias – rejeição de dispersos. Disponível em: <http://jcolivieri.sites.uol.com.br/>. Acesso em: 09 dez. 2010.

- 68 LEE,S.H.; SUH, J.K. Determination of mercury in tuna fish tissue using isotope dilution-inductively coupled plasma mass spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 80, p. 233-236, 2005.
- 69 INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos**. rev. 02, Rio de Janeiro: INMETRO, junho-2007. (DOQ-CGCRE-008).
- 70 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Ensaio de proficiência por comparações interlaboratoriais – Parte 1: Desenvolvimento e operação de programas de ensaios de proficiência**. Rio de Janeiro: ABNT, 1999. (ISO/IEC GUIA 43-1).
- 71 ALBERT, R.; HORWITZ, W. A heuristic derivation of the Horwitz curve. **Anal. Chem.** 69, 789-790, 1997.
- 72 LAPPONI, J.C. Estatística usando Excel 5 e 7, Lapponi Treinamento e Editora Ltda, São Paulo, 1997.
- 73 WEBSTER, R.K. Isotope dilution analysis. In: WALDRON, J.D., ed. *Advances in mass spectrometry: proceedings of a joint conference, held in London, 24-26 set., 1958*. New York, McMillan, 1959.