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

**PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE UM MATERIAL DE
REFERÊNCIA DE MEXILHÃO *Perna perna* (Linnaeus, 1758)**

EDSON GONÇALVES MOREIRA

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

Orientadora:
Dra. Marina Beatriz Agostini Vasconcellos

SÃO PAULO
2010

*Como incentivo aos anos de dedicação aos estudos,
dedico este trabalho à Sophia*

Agradecimentos

Devido a seu caráter colaborativo, este estudo não teria sido possível sem o apoio e participação de grande número de pessoas e organizações. Gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos a todos que, de uma forma ou outra, deram sua valiosa contribuição. Em especial,

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, por estar sempre de portas abertas ao desenvolvimento de seus servidores;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, à Agência Internacional de Energia Atômica e à Pró-reitoria de Pós-graduação da Universidade de São Paulo pelo auxílio financeiro ao projeto;

Aos colegas e amigos do Centro de Reator de Pesquisa, que criaram o ambiente de trabalho propício a este estudo. Em especial àqueles que efetivamente “colocaram a mão na massa” durante a coleta do material (Andreza, Marília, Regina e Vera);

À Dra. Marina Beatriz Agostini Vasconcellos, pelo apoio, sugestões e confiança em meu trabalho;

À Dra. Vera Akiko Maihara, presente em todas as etapas do trabalho, pela discussão, sugestões e por estar presente nos bons momentos e nos momentos difíceis;

À Dra. Marília Gabriela Miranda Catharino Semmler pela amizade e compartilhamento de taxa de bancada;

À Dra. Mitiko Saiki, pelo apoio e auxílio na medição de amostras durante tantos fins de semana;

À Dra. Ana Paula de Souza Lima, pelo auxílio na medição de amostras e no cálculo de concentrações por INAA;

À Dra. Eduinetty Ceci Pereira Moreira de Sousa, à M. Sc. Márcia Regina Gasparro, ao Dr. Camilo Dias Seabra Pereira e à Dra. Letícia Pires Zanoni, do Laboratório de Ecotoxicologia Marinha do Instituto Oceanográfico da USP, pela vivência sobre a biologia de organismos marinhos;

À Dra. Mônica Beatriz Mathor do Centro de Tecnologia das Radiações do IPEN - CNEN/SP pela presteza e disponibilidade para a realização do estudo de atividade microbiológica;

À M. Sc. Yasko Kodama e à Dra. Luci Diva Brocardo Machado do Centro de Tecnologia das Radiações do IPEN - CNEN/SP, pelo auxílio na obtenção das curvas termoanalíticas;

Ao Dr. José Roberto Martinelli, do Centro de Ciências e Tecnologia de Materiais do IPEN - CNEN/SP pelo auxílio na caracterização granulométrica;

À Dra. Maria do Carmo Freitas, ao Dr. Manh-Dung Ho, ao Dr. Daniel Beasley e à Isabel Dionísio do Reator Português de Investigação, pelas análises por k_0 -INAA;

Ao Dr. Renato Semmler e ao Dr. Mário Olímpio de Menezes pela compilação do programa para cálculo de médias robustas;

A todas as instituições que participaram do programa colaborativo para caracterização do material de referência, e especialmente a seus funcionários e colaboradores; colegas que doaram seu tempo e conhecimentos ao projeto;

À Dra. Andreza Portela Ribeiro, companheira de corridas;

À Suzane e Sophia, pelo apoio e pelo amor, mas também pela compreensão nas inevitáveis ausências.

*Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive*

*Fernando Pessoa
Odes de Ricardo Reis
14 de fevereiro de 1933*

*I close my eyes
Only for a moment and the moment's gone
All my dreams
Pass before my eyes, a curiosity*

*Dust in the wind
All they are is dust in the wind*

*Same old song
Just a drop of water in an endless sea
All we do
Crumbles to the ground
Though we refuse to see*

*Dust in the wind
All we are is dust in the wind*

Ohh...

*Now don't hang on
Nothin' lasts forever but the earth and sky
It slips away
And all your money won't another minute buy*

*Dust in the wind
All we are is dust in the wind (All we are is dust in the wind)
Dust in the wind (Everything is dust in the wind)
Everything is dust in the wind*

*Kansas
Dust in the Wind
Point of Know Return
1977*

PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE UM MATERIAL DE REFERÊNCIA DE MEXILHÃO *Perna perna* (Linnaeus, 1758)

Edson Gonçalves Moreira

RESUMO

A utilização de materiais de referência certificados em análise química é requisito importante em sistemas de garantia da qualidade, pois permite que métodos analíticos sejam validados e que seja obtida a rastreabilidade metrológica de resultados. Isso permite que se obtenham resultados válidos e comparáveis entre si, tanto no espaço quanto no tempo. Neste trabalho, foram realizadas todas as etapas para o preparo de um material de referência de mexilhão nacional, desde a coleta até as etapas de processamento tais como liofilização, moagem, envase e esterilização. Foram utilizados princípios internacionalmente aceitos para a avaliação da homogeneidade e da estabilidade do material, utilizando-se as técnicas analíticas de análise por ativação neutrônica instrumental e espectrometria de absorção atômica. Por meio da organização de programa colaborativo, com a participação de laboratórios nacionais e estrangeiros, foi realizada a caracterização química do material de referência de mexilhão, com determinação de elementos que ocorrem na faixa de porcentagem em massa a mg kg^{-1} , no total de 47 elementos, além de alguns radionuclídeos naturalmente presentes no material. Com a aplicação de técnicas estatísticas adequadas, considerou-se que há possibilidade de certificação de 11 desses elementos: As, Ca, Cl, Co, K, Mg, Mn, Na, Se, Th e Zn. Esse estudo pode ser considerado passo importante no desenvolvimento metrológico nacional, pois demonstra que a produção e caracterização de materiais de referência biológicos, de mexilhão em particular, é viável no Brasil, como ferramenta de garantia da qualidade para estudos ambientais e nutricionais realizados no país.

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF A *Perna perna* (Linnaeus, 1758) MUSSEL REFERENCE MATERIAL

Edson Gonçalves Moreira

ABSTRACT

The use of certified reference materials in chemical analysis is an important requirement in quality assurance systems, as it allows the validation of analytical methods and the realization of the metrological traceability of results. Then, it is possible to obtain valid and comparable results not only in space, but also in time. In this study, all the steps for the preparation of a national mussel reference material were attained, from the collection of the bulk material to processing steps such as freeze-drying, grinding, bottling and sterilization. Internationally accepted principles were applied for the homogeneity and stability assessment of the material, using instrumental neutron activation analysis and atomic absorption spectrometry as analytical techniques. By means of a collaborative program with participation of Brazilian and foreign laboratories, the chemical characterization of the material was performed. Element content in the mass percentage to mg kg^{-1} range was determined for 47 elements and some radionuclides, naturally present in the material. With the application of suitable statistical treatment to the data, it was considered that the content of 11 of those elements may be certified: As, Ca, Cl, Co, K, Mg, Mn, Na, Se, Th and Zn. This study may be considered an important step in the national metrological development, as it shows that the production and characterization of biological reference materials, mussel in particular, is feasible in Brazil, as a tool for quality assurance of environmental and nutritional studies performed in the country.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	23
1.1 A importância da utilização de materiais de referência	23
1.2 Mexilhões como fonte de alimento e em monitoramento ambiental	28
1.3 Proposta de preparo e caracterização de um material de referência de mexilhão	33
2 CONSIDERAÇÕES SOBRE O PREPARO E A CARACTERIZAÇÃO	35
2.1 Panorama sobre a produção de materiais de referência biológicos marinhos	35
2.2 Preparo do material de referência de mexilhão	42
2.3 Caracterização do material de referência de mexilhão	44
2.3.1 Processo de esterilização com radiação gama	44
2.3.2 Determinação de umidade residual	46
2.3.3 Caracterização granulométrica	47
2.3.4 Caracterização dos elementos de interesse	48
2.3.4.1 Estudo de homogeneidade	48
2.3.4.2 Estudo de estabilidade	49
2.3.4.3 Programa colaborativo para certificação	50
3 PARTE EXPERIMENTAL	52
3.1 Preparo do material de referência	52
3.1.1 Obtenção do lote de mexilhões	52
3.1.2 Pré-tratamento	53
3.1.3 Liofilização	54
3.1.4 Ajuste do tamanho de partículas	55
3.1.5 Controle de umidade	56
3.1.6 Homogeneização	56
3.1.7 Envase	57
3.1.8 Estudo de atividade microbiológica	58
3.1.9 Esterilização com radiação gama	58
3.1.10 Armazenamento	59
3.2 Determinação da umidade residual	59
3.3 Caracterização granulométrica	60
3.4 Determinação de elementos por Análise por Ativação Neutrônica Instrumental	61

3.4.1 Preparo de amostras e padrões para irradiação	61
3.4.2 Irradiação e medição das radiações induzidas	62
3.5 Determinação de elementos por Análise por Ativação Neutrônica Instrumental com padronização k_0	65
3.5.1 Preparo de amostras	65
3.5.2 Irradiação e medição das radiações induzidas	65
3.6 Determinação de elementos por Espectrometria de Absorção Atômica	66
3.6.1 Digestão ácida	67
3.6.2. Preparo de soluções	68
3.6.2.1 Soluções padrão de mercúrio	68
3.6.2.2 Soluções padrão de cádmio	68
3.6.2.3 Soluções padrão de chumbo	69
3.6.2.4 Soluções complementares	70
3.6.3 Parâmetros de análise	71
3.6.3.1 Determinação de mercúrio	71
3.6.3.2 Determinação de cádmio	71
3.6.3.3 Determinação de chumbo	72
3.6.4 Descontaminação de material volumétrico	73
3.7 Estudo de homogeneidade por INAA	74
3.8 Estudo de homogeneidade por k_0 -INAA	74
3.9 Estudo de homogeneidade por AAS	74
3.10 Estudos de estabilidade por INAA	75
3.11 Estudo de estabilidade por AAS	76
3.12 Programa colaborativo para certificação	76
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
4.1 Estudo de atividade microbológica	77
4.2 Esterilização com radiação gama	79
4.3 Determinação de composição centesimal	80
4.4 Determinação de umidade residual	80
4.5 Caracterização granulométrica	85
4.6 Caracterização de elementos de interesse	89
4.6.1 Validação de métodos analíticos	89
4.6.1.1 Análise por ativação neutrônica instrumental	90
4.6.1.1.1 Limites de detecção e quantificação	90
4.6.1.1.2 Incerteza de medição associada à análise por ativação neutrônica	91

4.6.1.1.3 Análise de materiais de referência certificados por INAA	94
4.6.1.2 Espectrometria de absorção atômica	99
4.6.1.2.1 Estudo do comportamento eletrotérmico	99
4.6.1.2.2 Limites de detecção e quantificação	100
4.6.1.2.3 Incerteza de medição associada à espectrometria de absorção atômica	101
4.6.1.2.4 Análise de materiais de referência certificados por AAS	103
4.6.2 Estudo de homogeneidade entre frascos	105
4.6.2.1 Estudo por INAA	105
4.6.2.2 Estudo por INAA, com utilização de fotopicos complementares	112
4.6.2.3 Estudo por k_0 -INAA	116
4.6.2.4 Estudo por AAS	119
4.6.3 Estudo de homogeneidade dentro do frasco	122
4.6.3.1 Estudo por INAA	122
4.6.3.2 Estudo por AAS	128
4.6.4 Estudo de estabilidade a curto prazo	132
4.6.4.1 Estudo por INAA	132
4.6.4.2 Estudo por AAS	141
4.6.5 Estudo de estabilidade a longo prazo	147
4.6.5.1 Estudo por INAA	147
4.6.5.2 Estudo por AAS	154
4.6.6 Programa colaborativo para certificação	158
4.6.6.1 Determinação de valores de consenso	160
4.6.6.2 Atribuição de valores certificados	172
4.6.6.2.1 Estimativa de incertezas padrão devidas à homogeneidade entre frascos	172
4.6.6.2.2 Estimativa de incertezas padrão devidas à estabilidade	174
4.6.6.2.3 Estimativa de incertezas padrão dos valores de propriedade	176
4.6.6.2.4 Atribuição dos valores de propriedade	179
5 CONCLUSÕES	186
APÊNDICE A – Carta convite para participação no programa colaborativo para caracterização do candidato a material de referência de mexilhão	187
APÊNDICE B – Formulário para envio dos resultados do programa colaborativo para caracterização do candidato a material de referência de mexilhão	188
APÊNDICE C – Gráficos EDA obtidos para os resultados do estudo de homogeneidade entre frascos por INAA: a) gráfico sequencial dos resultados; b) gráfico da variação entre resultados adjacentes (<i>lag plot</i>); c) histograma e d) gráfico de probabilidade	192
APÊNDICE D – Teste de Shapiro-Wilk para normalidade a 95 % de confiança	196

APÊNDICE E – Investigação de tendências no estudo de homogeneidade entre frascos: a) resultados apresentados por ordem de medição com ajuste de curva linear; b) resultados apresentados por ordem de frasco com ajuste de curva linear	201
APÊNDICE F – Desvio padrão relativo em função da massa para o estudo de homogeneidade dentro do frasco por INAA. Estimativa do desvio padrão de repetitividade do método (-----)	214
APÊNDICE G – Investigação de tendência no estudo de estabilidade a curto prazo pro INAA, com resultados por ordem de tempo e ajuste de curva linear	216
APÊNDICE H – Razões Q_T para os estudos de estabilidade	220
APÊNDICE I – Investigação de tendências no estudo de estabilidade a longo prazo: a) resultados apresentados por ordem de medição com ajuste de curva linear; b) resultados apresentados por ordem de tempo com ajuste de curva linear	223
APÊNDICE J – Gráficos de Youden para os resultados do programa colaborativo	232
APÊNDICE K – Média e intervalo de confiança em base seca (frascos A e B), ordenados por ordem de concentração, para os resultados reportados pelos participantes do programa colaborativo para caracterização do candidato a MRC	238
APÊNDICE L – Contribuições da incerteza de caracterização, u_{car} , da incerteza devida à homogeneidade, u_{bb} , e da incerteza devida à estabilidade a longo prazo, u_{lts} , para as incertezas padrão combinadas associadas aos valores de concentração, u_{MRC} , no candidato a MR de mexilhão	249
APÊNDICE M – Artigos publicados	253
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	275

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 Produção mundial de mexilhões, em toneladas por ano (FAO, 2009)

TABELA 2.1 Materiais de referência biológicos de origem marinha identificados no banco de dados internacional de MRCs (COMAR, 2007)

TABELA 2.2 Analitos caracterizados em MR biológicos marinhos (COMAR, 2007)

TABELA 3.1 Preparo dos padrões pipetados para a INAA do candidato a MR de mexilhão

TABELA 3.2 MRCs utilizados para o estudo por INAA

TABELA 3.3 Radionuclídeos utilizados para determinação elementar por INAA (IAEA, 1990)

TABELA 3.4 Radionuclídeos utilizados para determinação elementar por k_0 -INAA (IAEA, 1990)

TABELA 3.5 Diluições para o preparo das soluções padrão de mercúrio

TABELA 3.6 Diluições para o preparo das soluções padrão de cádmio

TABELA 3.7 Diluições para o preparo das soluções padrão de chumbo

TABELA 3.8 Parâmetros utilizados para a determinação de mercúrio por CV AAS

TABELA 3.9 Parâmetros utilizados para a determinação de cádmio por ET AAS

Tabela 3.10 Parâmetros do programa de aquecimento do forno de grafite para a determinação de cádmio por ET AAS

TABELA 3.11 Parâmetros utilizados para a determinação de chumbo por ET AAS

TABELA 3.12 Parâmetros do programa de aquecimento do forno de grafite para a determinação de chumbo por ET AAS

TABELA 4.3.1 Dados de informação nutricional, por 100 g de amostra liofilizada

TABELA 4.4.1 Umidade residual no candidato a MR de mexilhão determinado em estufa a 85°C por 24h

TABELA 4.5.1 Frações peneiradas do candidato a MR de mexilhão

TABELA 4.6.1.1 Limites de detecção, L_D , e de quantificação, L_Q , em mg kg^{-1} , determinados por INAA, com utilização de 0,150 g de amostra de candidato a material de referência de mexilhão (CURRIE, 1999)

TABELA 4.6.1.2 Concentrações dos elementos, em mg kg^{-1} , obtidas por INAA, para sub-amostra do frasco 143, com incertezas associadas (base úmida)

TABELA 4.6.1.3 Concentrações médias dos elementos, em mg kg^{-1} , obtidas por INAA, para os materiais de referência certificados utilizados neste trabalho

TABELA 4.6.1.4 Limites de detecção, L_D , e de quantificação, L_Q , em mg kg^{-1} , determinados por AAS, com utilização de 0,350 g de amostra de candidato a material de referência de mexilhão (WELZ e SPERLING, 1999)

TABELA 4.6.1.5 Concentrações de Cd, Hg e Pb, em $\mu\text{g kg}^{-1}$, obtidas por AAS, para sub-amostra do frasco 143, com incertezas associadas (base úmida)

TABELA 4.6.1.6 Concentrações médias de elementos, em $\mu\text{g kg}^{-1}$, obtidas por AAS, para os materiais de referência certificados utilizados neste trabalho

TABELA 4.6.2.1 Concentrações de elementos, em mg kg^{-1} , obtidas por INAA, para o estudo de homogeneidade entre frascos (base úmida)

TABELA 4.6.2.2 Estatísticas da ANOVA da regressão linear para o estudo de homogeneidade entre frascos, para os resultados obtidos por INAA

TABELA 4.6.2.3 Estatísticas da ANOVA para os valores médios de cada frasco, obtidos por INAA, para o estudo de homogeneidade entre frascos

TABELA 4.6.2.4 Estatísticas da ANOVA para os valores médios de cada frasco, obtidos por INAA, para o estudo de homogeneidade entre frascos, utilizando-se fotopicos de energias diferentes

TABELA 4.6.2.5 Concentrações de elementos, obtidas por k_0 -INAA, para o estudo de homogeneidade entre frascos (base úmida)

TABELA 4.6.2.6 Estatísticas da ANOVA da regressão linear para o estudo de homogeneidade entre frascos, para os resultados obtidos por k_0 -INAA

TABELA 4.6.2.7 Estatísticas da ANOVA para os valores médios de cada frasco, obtidos por k_0 -INAA, para o estudo de homogeneidade entre frascos

TABELA 4.6.2.8 Concentrações de elementos, em $\mu\text{g kg}^{-1}$, obtidas por AAS, para o estudo de homogeneidade entre frascos (base úmida)

TABELA 4.6.2.9 Estatísticas da ANOVA da regressão linear para o estudo de homogeneidade entre frascos, para os resultados obtidos por AAS

TABELA 4.6.2.10 Estatísticas da ANOVA para os valores médios de cada frasco, obtidos por AAS, para o estudo de homogeneidade entre frascos

TABELA 4.6.3.1 Estatísticas de ANOVA para os valores médios de cada massa, obtidos por INAA, no estudo de homogeneidade dentro do frasco

TABELA 4.6.3.2 Concentrações de elementos, em mg kg^{-1} , obtidas por INAA para massas diferentes de amostra, para o estudo de homogeneidade dentro do frasco (base úmida)

TABELA 4.6.3.3 Estimativa de massa mínima do candidato a MR de mexilhão, obtidas por INAA

TABELA 4.6.3.4 Estatísticas da ANOVA para os valores médios de cada massa, obtidos por AAS, no o estudo de homogeneidade dentro do frasco

TABELA 4.6.3.5 Concentrações de elementos, em $\mu\text{g kg}^{-1}$, obtidas por AAS, para massas diferentes de amostra, para o estudo de homogeneidade dentro do frasco (base úmida)

TABELA 4.6.3.6 Estimativa de massa mínima do candidato a MR de mexilhão, obtidas por AAS

TABELA 4.6.4.1 Concentração de elementos, em mg kg^{-1} , obtidas por INAA, para o estudo de estabilidade a curto prazo (base úmida)

TABELA 4.6.4.2 Estatísticas da ANOVA para os valores médios de cada frasco, obtidos por INAA, para o estudo de estabilidade a curto prazo

TABELA 4.6.4.3 Estatísticas da ANOVA para os valores médios dos frascos armazenados a 20°C em comparação com o frasco controle, obtidos por INAA, para o estudo de estabilidade a curto prazo

TABELA 4.6.4.4 Estatísticas da ANOVA para os valores médios dos frascos armazenados a 40°C em comparação com o frasco controle, obtidos por INAA, para o estudo de estabilidade a curto prazo

TABELA 4.6.4.5 Estatísticas da ANOVA para os valores médios dos frascos armazenados a 60°C em comparação com o frasco controle, obtidos por INAA, para o estudo de estabilidade a curto prazo

TABELA 4.6.4.6 Resultados normalizados, Q_T , obtidos por INAA, para o estudo de estabilidade a curto prazo

TABELA 4.6.4.7 Concentrações de elementos em $\mu\text{g kg}^{-1}$, obtidas por AAS, para o estudo de estabilidade a curto prazo (base úmida)

TABELA 4.6.4.8 Estatísticas da ANOVA para os valores médios de cada frasco, obtidos por AAS, para o estudo de estabilidade a curto prazo

TABELA 4.6.4.9 Estatísticas da ANOVA para os valores médios dos frascos armazenados a 20°C em comparação com o frasco controle, obtidos por AAS, para o estudo de estabilidade a curto prazo

TABELA 4.6.4.10 Estatísticas da ANOVA para os valores médios dos frascos armazenados a 40°C em comparação com o frasco controle, obtidos por AAS, para o estudo de estabilidade a curto prazo

TABELA 4.6.4.11 Estatísticas da ANOVA para os valores médios dos frascos armazenados a 60°C em comparação com o frasco controle, obtidos por AAS, para o estudo de estabilidade a curto prazo

TABELA 4.6.4.12 Resultados normalizados, Q_T , obtidos por AAS, para o estudo de estabilidade a curto prazo

TABELA 4.6.5.1 Concentração de elementos, em mg kg^{-1} , obtidas por INAA, para o estudo de estabilidade a longo prazo (base úmida)

TABELA 4.6.5.2 Estatísticas da ANOVA da regressão linear para o estudo de estabilidade a longo prazo, para os resultados obtidos por INAA

TABELA 4.6.5.3 Resultados de ANOVA para o teste de estabilidade a longo prazo, obtidos por INAA

TABELA 4.6.5.4 Resultados normalizados para o estudo de estabilidade a longo prazo, obtidos por INAA

TABELA 4.6.5.5 Concentração de elementos em, $\mu\text{g kg}^{-1}$, obtidas por AAS, para o estudo de estabilidade a longo prazo (base úmida)

TABELA 4.6.5.6 Estatísticas da ANOVA da regressão linear para o estudo de estabilidade a longo prazo, para os resultados obtidos por AAS

TABELA 4.6.5.7 Resultados de ANOVA para o teste de estabilidade a longo prazo, obtidos por AAS

TABELA 4.6.5.8 Resultados normalizados para o estudo de estabilidade a longo prazo, obtidos por AAS

TABELA 4.6.6.1 Resultados reportados, em mg kg^{-1} , pelos participantes do programa colaborativo para caracterização do candidato a MR de mexilhão para os dois frascos enviados (base seca)

TABELA 4.6.6.2 Estimativas para os valores de tendência central e incertezas de caracterização, mg kg^{-1} , para os resultados do programa colaborativo para caracterização do candidato a MR de mexilhão

TABELA 4.6.6.3 Estimativa da incerteza padrão devida à homogeneidade entre frascos, em mg kg^{-1} , para resultados obtidos por INAA, k_0 -INAA e AAS

TABELA 4.6.6.4 Estimativa da incerteza padrão devida à estabilidade a longo prazo, em mg kg^{-1} , para resultados obtidos por INAA e AAS e tempo de prateleira de 24 meses

TABELA 4.6.6.5 Estimativas das incertezas padrão combinadas, em mg kg^{-1} , para os valores de concentração dos elementos analisados no programa colaborativo para caracterização do candidato a material de referência de mexilhão

TABELA 4.6.6.6 Informações para a decisão sobre a atribuição de valores certificados ao candidato a material de referência de mexilhão

TABELA 4.6.6.7 Valores informativos para a concentração, em %, atribuídos aos elementos determinados no MR de mexilhão

TABELA 4.6.6.8 Valores informativos para a concentração, em mg kg^{-1} , atribuídos aos elementos determinados no MR de mexilhão

TABELA 4.6.6.9 Valores informativos para a concentração de atividade, em Bq kg^{-1} , atribuídos aos elementos determinados no MR de mexilhão

TABELA 4.6.6.10 Valores de referência para a concentração, em mg kg^{-1} , atribuídos aos elementos determinados no MR de mexilhão

TABELA 4.6.6.11 Valores certificados para a concentração, em mg kg^{-1} , atribuídos aos elementos determinados no MR de mexilhão

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 Distribuição geográfica de espécies de mexilhão (GOSLING, 2003)

FIGURA 2.1. Etapas do preparo do material de referência de mexilhão

FIGURA 3.1.1 Área do cultivo de mexilhões na Praia da Cocanha em Caraguatatuba

FIGURA 3.1.2 Aspecto de uma corda de mexilhões de cultivo

FIGURA 3.1.3 Tratamento prévio dos mexilhões

FIGURA 3.1.4 Homogeneização do tecido mole dos mexilhões (a) e armazenamento em embalagens estéreis (b)

FIGURA 3.1.5 Liofilização do candidato a material de referência

FIGURA 3.1.6 Ajuste do tamanho de partículas por peneiramentos sucessivos

FIGURA 3.1.7 Homogeneizador em Y Marconi MA 201/10MO/E

FIGURA 3.1.8 Envase do candidato a material de referência de mexilhão

FIGURA 3.1.9 Preparo das placas de cultivo

FIGURA 3.1.10 Arranjo experimental para a irradiação com raios gama do candidato a material de referência

FIGURA 3.8.1 Planejamento isócrono para o estudo de estabilidade a curto prazo

FIGURA 3.8.2 Planejamento isócrono para o estudo de estabilidade a longo prazo

FIGURA 4.1.1 Aspecto das membranas controle (a) e irradiada (b) após uma semana de incubação

FIGURA 4.1.2 Desenvolvimento de diferentes tipos de colônia para a amostra não irradiada

FIGURA 4.1.3 Contagem de unidades formadoras de colônia por massa de amostra após irradiação com diversas doses

FIGURA 4.4.1 Curvas TG/DTG obtidas em cadinho de platina, sob atmosfera dinâmica de ar a 50 mL/min e taxa de aquecimento de 10 °C/min para o candidato a MR de mexilhão

FIGURA 4.4.2 Curvas TG obtidas em cadinho de platina, sob atmosfera dinâmica de ar a 50 mL/min e a diversas taxas de aquecimento para o candidato a MR de mexilhão

FIGURA 4.4.3 Curvas TG isotérmicas (60, 85 e 100°C) obtidas em cadinho de platina, sob atmosfera dinâmica de ar a 50 mL/min para o candidato a MR de mexilhão

FIGURA 4.4.4 Curvas TG isotérmicas a 85 °C, obtidas em cadinho de platina, sob atmosfera dinâmica de ar a 50 mL/min para três sub-amostras do frasco 73 do candidato a MR de mexilhão

FIGURA 4.5.1 Perfil da distribuição granulométrica obtida para o frasco 52

FIGURA 4.5.2 Perfil das distribuições granulométricas obtidas para frações com várias granulometrias

FIGURA 4.5.3 Ajuste de curva gaussiana à distribuição granulométrica do candidato a MR de mexilhão

FIGURA 4.5.4 Distribuição granulométrica para os frascos 52, 100 e 162

FIGURA 4.5.5 Comparação da distribuição granulométrica do candidato a material de referência de mexilhão (MR) e diversos MRCs

FIGURA 4.6.1.1 Diagrama de causa e efeito para a determinação de elementos por INAA

FIGURA 4.6.1.2 Escores z , ordenados por ordem crescente, calculados para as concentrações dos elementos nos materiais de referência certificados, obtidas por INAA

FIGURA 4.6.1.3 Escores z , calculados para as concentrações dos elementos nos materiais de referência certificados, obtidas por INAA e apresentados em duas escalas na ordenada

FIG 4.6.1.4 Curvas de temperatura de pirólise e de atomização para Cd e Pb no candidato a MR de mexilhão

FIGURA 4.6.1.5 Diagrama de causa e efeito para a determinação de elementos por AAS

FIGURA 4.6.1.6 Escores z , calculados para as concentrações de Cd, Hg e Pb nos materiais de referência certificados, obtidas por AAS

FIGURA 4.6.2.1 Gráficos EDA obtidos para o estudo de homogeneidade entre frascos para Fe por INAA: a) gráfico sequencial dos resultados; b) gráfico da variação entre resultados adjacentes (*lag plot*), c) histograma e d) gráfico de probabilidade normal

FIGURA 4.6.2.2 Investigação de tendência no estudo de homogeneidade entre frascos do Na por INAA: a) resultados apresentados por ordem de medição com ajuste de curva linear; b) resultados apresentados por ordem de frasco com ajuste de curva linear

FIGURA 4.6.2.3 Diagramas de caixa para os resultados do estudo de homogeneidade entre frascos por INAA para oito sub-amostras, utilizando-se fotopicos de energias diferentes

FIGURA 4.6.2.4 Investigação de tendência no estudo de homogeneidade entre frascos do V por k_0 -INAA: a) resultados apresentados por ordem de medição com ajuste de curva linear; b) resultados apresentados por ordem de frasco com ajuste de curva linear

FIGURA 4.6.2.5 Investigação de tendência no estudo de homogeneidade entre frascos do Hg por AAS: a) resultados apresentados por ordem de medição com ajuste de curva linear; b) resultados apresentados por ordem de frasco com ajuste de curva linear

FIGURA 4.6.3.1 Investigação de tendência no estudo de homogeneidade dentro do frasco para Na e Ag, por INAA. Resultados apresentados por ordem de massa, com ajuste de curva linear

FIGURA 4.6.3.2 Desvio padrão relativo em função da massa para o estudo de homogeneidade dentro do frasco por INAA para elementos selecionados. Estimativa do desvio padrão de repetitividade do método (- - - - -)

FIGURA 4.6.3.3 Investigação de tendência no estudo de homogeneidade dentro do frasco do Pb por AAS: a) resultados apresentados por ordem de medição com ajuste de curva linear; b) resultados apresentados por ordem de massa com ajuste de curva linear

FIGURA 4.6.3.4 Desvio padrão relativo em função da massa para o estudo de homogeneidade dentro do frasco por AAS. Estimativa do desvio padrão de repetitividade do método (- - - - -)

FIGURA 4.6.4.1 Investigação de tendência no estudo de estabilidade a curto prazo para elementos selecionados por INAA, com resultados apresentados por ordem de tempo e ajuste de curva linear

FIGURA 4.6.4.2 Razões Q_T para o estudo de estabilidade a curto prazo por INAA para elementos selecionados

FIGURA 4.6.4.3 Investigação de tendência no estudo de estabilidade a curto prazo de Hg, Cd e Pb por AAS, com resultados apresentados por ordem de tempo e ajuste de curva linear

FIGURA 4.6.4.4 Razões Q_T para o estudo de estabilidade a curto prazo por AAS

FIGURA 4.6.5.1 Investigação de tendência no estudo de estabilidade a longo prazo do Se por INAA: a) resultados apresentados por ordem de medição com ajuste de curva linear; b) resultados apresentados por ordem de tempo com ajuste de curva linear

FIGURA 4.6.5.2. Razões Q_T para o estudo de estabilidade a longo prazo por INAA para elementos selecionados

FIGURA 4.6.5.3 Investigação de tendência no estudo de estabilidade a longo prazo do Hg por AAS: a) resultados apresentados por ordem de medição com ajuste de curva linear; b) resultados apresentados por ordem de tempo com ajuste de curva linear

FIGURA 4.6.5.4. Razões Q_T para o estudo de estabilidade a longo prazo por AAS

FIGURA 4.6.6.1 Ordens de grandeza para as concentrações dos elementos determinados no candidato a MR de mexilhão pelo programa colaborativo

FIGURA 4.6.6.2 Gráficos de Youden para os resultados do programa colaborativo para elementos selecionados. Médias robustas H15 (—)

FIGURA 4.6.6.3 Média e intervalo de confiança em base seca (frascos A e B), ordenados por ordem de concentração, para os resultados reportados pelos participantes do programa colaborativo para certificação do candidato a MRC. Média robusta H15 (—), Incerteza expandida de caracterização, $k = 2$ (- - - - -)

FIGURA 4.6.6.4 Contribuições da incerteza de caracterização, u_{car} , da incerteza devida à homogeneidade, u_{bb} e da incerteza devida à estabilidade a longo prazo, u_{lts} , para as incertezas padrão combinadas associadas aos valores de concentração, u_{MRC} , para elementos selecionados no candidato a MR de mexilhão

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a , coeficiente angular;
 a , número de resultados por conjunto, do teste de ANOVA;
 A , absorvância da amostra em AAS;
 $A15$, média robusta de caracterização, algoritmo A15 de Hubert;
 AAS, Espectrometria de Absorção Atômica, Atomic Absorption Spectrometry;
 ABNT, Associação Brasileira de Normas Técnicas;
 ANOVA, Análise de Variância, Analysis of Variance;
 ARCAL, Acordo Regional de Cooperação para a Promoção da Ciência e da Tecnologia Nucleares na América Latina e no Caribe;
 A_u , atividade da amostra;
 A_s , atividade do elemento no padrão;
 b , coeficiente linear;
 BERM, Simpósio sobre Materiais de Referência Ambientais e Biológicos, Biological and Environmental Reference Materials Symposium;
 BIPM, Comitê Internacional de Pesos e Medidas, Bureau International des Poids et Mesures;
 C , concentração;
 C_{cert} , valor certificado para a concentração;
 CCTM, Centro de Ciências e Tecnologia de Materiais do IPEN - CNEN/SP;
 CEBIMar/USP, Centro de Biologia Marinha de São Sebastião da Universidade de São Paulo;
 CENA/USP, Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo;
 CETEM, Centro de Tecnologia Mineral;
 CGCRE/INMETRO, Coordenação Geral de Acreditação do INMETRO;
 CNEN, Comissão Nacional de Energia Nuclear;
 CRPq, Centro do Reator de Pesquisa do IPEN - CNEN/SP;
 CTR, Centro de Tecnologia das Radiações do IPEN - CNEN/SP;
 curva TG/DTG, curva termogravimétrica e termogravimétrica derivada;
 CV AAS, Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Vapor Frio, Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry;
 D_{10} , valor de redução decimal;
 DP, desvio padrão;
 DPR, desvio padrão relativo;
 DQUIM/INMETRO, Divisão de Metrologia Química do INMETRO;
 EDA, Análise Exploratória de Dados, Exploratory Data Analysis;
 EDL, Lâmpada de descarga sem eletrodo, Eletrodeless Discharge Lamp;
 EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária;
 ESALQ-USP, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo;
 ET AAS, Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica, Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry;
 F AAS, Espectrometria de Absorção Atômica com Chama, Flame Atomic Absorption Spectrometry;
 FAO, Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, Food and Agriculture Organization of the United Nations;
 F , estatística da distribuição F ;
 F_c , valor crítico da distribuição F ;
 FCFRP-USP, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP;
 FIG, figura;
 FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo;
 FIMS, Sistema para Mercúrio com Injeção em Fluxo, Flow Injection Mercury System;

FINEP, Financiadora de Estudos e Projetos;
 FWHM, largura total à meia altura, full width at half-maximum;
 H_0 , hipótese nula da análise de variância
 H15, média robusta de caracterização, algoritmo H15 de Hubert;
 IAEA, Agência Internacional de Energia Atômica, International Atomic Energy Agency;
 IC, intervalo de confiança;
 ICP OES, Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado, Inductively Coupled Plasma Optic Emission Spectrometry;
 IEC, Comissão Eletrotécnica Internacional, International Electrotechnical Commission;
 IO-USP, Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
 IG-UNICAMP, Instituto de Geociências da Universidade de Campinas;
 INAA, Análise por Ativação Neutrônica Instrumental, Instrumental Neutron Activation Analysis;
 INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial;
 IPEN - CNEN/SP, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares;
 IP/SAA-SP, Instituto de Pesca da Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo;
 IPT, Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo;
 IQ-USP, Instituto de Química da Universidade de São Paulo;
 IRMM, Instituto para Materiais de Referência e Medições, Institute for Reference Materials and Measurement;
 ISO, Organização Internacional para Padronização, International Organization for Standardization;
 ITN, Instituto Tecnológico e Nuclear Português;
 IUPAC, União Internacional de Química Pura e Aplicada, International Union of Pure and Applied Chemistry;
 k , fator de abrangência;
 k_0 -INAA, Análise por Ativação Neutrônica Instrumental com padronização k_0 , Instrumental Neutron Activation Analysis with k_0 standardization;
 LA ICP-MS, Espectrometria de Massa com Fonte de Plasma Indutivamente Acoplado e Abrasão Superficial por Laser, Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry;
 LAN, Laboratório de Análise por Ativação Neutrônica do CRPq;
 lat., latitude;
 L_D , limite de detecção;
 lon., longitude;
 L_Q , limite de quantificação;
 m , massa do elemento a ser determinado no padrão por INAA;
 M , massa da amostra;
 MAD, desvio absoluto da mediana; median absolute deviation
 M_{ANOVA} , média de caracterização obtida por ANOVA;
 MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento;
 MCT, Ministério da Ciência e Tecnologia;
 MESL, Laboratórios de Estudos Ambientais Marinhos da IAEA, IAEA Marine Environment Studies Laboratories;
 M_M , média de caracterização obtida por método da IAEA;
 MQ, média quadrática da análise de variância;
 MQ_{dentro} , média quadrática dentro do frasco do teste de ANOVA;
 MQ_{entre} , média quadrática entre frascos do teste de ANOVA;
 MR, material de referência;
 MRC, material de referência certificado;
 m/v , relação massa-volume;
 n , número de determinações;
 n_i , número de conjuntos de resultados;
 n_0 , número de determinações, com correção para valores faltantes;
 NAA, Análise por Ativação Neutrônica, Neutron Activation Analysis;
 NBS, Agência Nacional de Padrões, National Bureau of Standards;

NIST, Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia dos Estados Unidos da América - National Institute for Standards & Technology;
 NMI, Instituto Metrológico Nacional, National Metrological Institute;
 NRCC, Conselho Nacional de Pesquisa do Canadá, National Research Council of Canada;
 p , número de conjuntos de resultados do teste de ANOVA;
 P. A., para análise, pro analysi;
 PBMQ, Programa Brasileiro de Metrologia em Química;
 PGNAA, Análise por Ativação Neutrônica com Nêutrons Prontos, Prompt Gamma Neutron Activation Analysis;
 Q_T , razão de concentrações obtidas a temperaturas diferentes;
 RF , número de contagens da radiação de fundo sob o pico do analito;
 R^2 , coeficiente de determinação do ajuste de curva linear;
 RPI, Reator Português de Investigação;
 s_{A15} , desvio padrão de A15;
 SAL, nível de garantia de segurança, security assurance level;
 SI, Sistema Internacional de Unidades;
 SIBRATEC, Sistema Brasileiro de Tecnologia;
 SIPRA, Sistema Pneumático Rápido do Reator Português de Investigação;
 s_{H15} , desvio padrão de H15;
 s_L^2 , variância entre frascos do teste de ANOVA;
 s_r , desvio padrão de repetitividade;
 s_r^2 , variância dentro do frasco do teste de ANOVA;
 SRM, Material de Referência Padrão, Standard Reference Material;
 s_T , desvio padrão para resultados obtidos na temperatura T;
 t , valor crítico superior da distribuição t de Student;
 T , temperatura;
 t_v , tempo total de medição da amostra (tempo vivo);
 TAB, tabela;
 TG, Termogravimetria, Thermogravimetry;
 t_u , tempo de decaimento da amostra;
 t_s , tempo de decaimento do padrão;
 $T_{1/2}$, meia vida;
 u_a , incerteza no coeficiente angular a ;
 u_{A15} , estimativa da incerteza de caracterização da média robusta A15;
 u_{ANOVA} , estimativa da incerteza de caracterização obtida por ANOVA;
 u_{bb} , incerteza padrão devida à homogeneidade entre frascos, standard uncertainty due to between-bottle homogeneity;
 u_{car} , incerteza padrão devida à caracterização;
 ufc , unidades formadoras de colônia;
 u_{H15} , estimativa da incerteza de caracterização da média robusta H15;
 u_{lts} , incerteza padrão devida à estabilidade a longo prazo, standard uncertainty due to long-term stability;
 u_M , estimativa da incerteza de caracterização da média obtida por método da IAEA;
 u_{MRC} , incerteza padrão combinada do valor de concentração;
 U_{MRC} , incerteza expandida do valor de concentração;
 U , incerteza expandida;
 U_{cert} , incerteza expandida do valor certificado;
 $U\%$, incerteza expandida relativa;
 u_{sts} , incerteza padrão devida à estabilidade a curto prazo, standard uncertainty due to short-term stability;
 u_T , estimativa da incerteza de medição para o teste de estabilidade;
 valor de p , valor de probabilidade;
 V , volume da amostra digerida;

VIM, Vocabulário internacional de metrologia - conceitos fundamentais e gerais e termos associados, International vocabulary of metrology - basic and general concepts and associated terms;

v/v, relação volume-volume;

W , estatística do teste de Shapiro-Wilk para normalidade;

WD XRF, Fluorescência de Raios X por Dispersão de Comprimento de Onda; Wavelength Dispersive X-Ray Fluorescence;

w_T , concentração obtida para temperatura de estudo T ;

$\tilde{Y}$, mediana;

Y_i , valores individuais do programa colaborativo;

α , nível de significância;

α -Spect., Espectrometria Alfa, Alpha Spectrometry;

λ , constante de decaimento;

μ -XRF, Micro Fluorescência de Raios X, micro X Ray Fluorescence;

σ_0 , desvio padrão de dez determinações do branco analítico;

ν , graus de liberdade;

1 INTRODUÇÃO

1.1 A importância da utilização de materiais de referência

A demonstração de que resultados analíticos são obtidos com qualidade, isto é, que são adequados ao uso pretendido, é requisito essencial na garantia da qualidade de produtos tanto na indústria quanto no comércio e em pesquisa aplicada, podendo afetar decisões econômicas e políticas de proteção ao meio ambiente e à saúde (ZSCHUNKE, 2000).

Em análises químicas, o analista deve demonstrar a qualidade de seu trabalho, isto é, que as fontes de erro estejam sobre controle, o que leva a resultados confiáveis. Uma maneira de atingir esse objetivo é a comparação do resultado obtido para uma amostra com um valor de referência de um material conhecido, o material de referência, MR, que possui valores de propriedade suficientemente homogêneos e bem estabelecidos. Assim, é possível identificar e quantificar substâncias de interesse na amostra de maneira apropriada (ABNT, 2000a).

MRs também são utilizados para validação de métodos analíticos, em estudos interlaboratoriais e testes de proficiência e em esquemas de controle estatístico de processo que utilizam gráficos ou cartas de controle (KRAMER e col., 2001). Quando os valores de propriedade do MR são certificados por procedimento que estabelece a rastreabilidade desses valores a um valor exato da unidade do Sistema Internacional de Unidades, SI, na qual os valores de propriedade são expressos, acompanhado de uma incerteza para um nível de confiança estabelecido, o MR é denominado material de referência certificado, MRC. No caso de MRCs de composição química, o valor de propriedade é a concentração dos diversos elementos ou substâncias químicas no material (ABNT, 2000a).

O papel da rastreabilidade dos valores certificados foi enfatizado em definição mais recente de MRCs. O certificado deve incluir, além dos valores de propriedade e incertezas associadas, declaração da rastreabilidade metrológica do material (JCGM, 2008; EMONS e col., 2006). A rastreabilidade metrológica é a propriedade de um resultado pela qual este pode ser relacionado a uma referência por meio de uma cadeia ininterrupta de

comparações, cada uma com sua contribuição à incerteza da medição. A referência pode ser uma unidade de medida definida, preferencialmente do sistema SI, um procedimento de medição, incluindo a unidade de medição no caso de mensurandos definidos pelo método ou procedimento ou um padrão de medição (por exemplo, um material de referência, uma solução de calibração ou um MRC de matriz). (JCGM, 2008). Dessa forma, os MRCs assumem papel fundamental para a pirâmide metrológica, isto é, como elementos chave para a comparabilidade global de resultados, por meio da rastreabilidade metrológica, desde os laboratórios “de campo” na base da pirâmide, até o Comitê Internacional de Pesos e Medidas, BIPM, e as definições das unidades do SI, passando pelos laboratórios de referência e Institutos Metrológicos Nacionais, NMI (KAARLS, 2009).

Em série de três artigos, Bièvre e colaboradores situam a importância e a dificuldade envolvidas na utilização do conceito metrológico de rastreabilidade de medições em química analítica. Os autores apresentam orientações práticas para a implantação de cadeias de rastreabilidade que vão do mensurando em uma amostra até a unidade do SI, sendo a qualidade da cadeia quantificada em termos da incerteza de cada elo da cadeia de rastreabilidade. Além disso, enfocam o uso de MRs para a rastreabilidade de medições químicas ao SI (BIÈVRE e col., 1996, 1997a, 1997b).

O maior problema é que, diferentemente do que ocorre em física ou no campo das engenharias, na maioria das vezes, as medições químicas não são realizadas em termos de mol, unidade SI para quantidade de matéria. Isto ocorre porque a definição de quantidade de matéria exige que sejam especificadas as entidades, entre diversas outras, que são consideradas para a medição, o que nem sempre é possível ou de interesse prático. Além disso, muitas vezes a medição é dependente da matriz na qual as entidades estão presentes (efeitos de matriz) e também pode haver incerteza sobre a natureza do que está sendo medindo. Outro ponto de destaque é que medições químicas são comumente mais precisas do que exatas. Já para medições mecânicas, elétricas ou térmicas, por exemplo, essas são realizadas de modo adequado, dependendo do propósito, com diversos níveis de exatidão, mesmo que este não corresponda à incerteza ótima para a expressão do resultado em relação ao SI. De qualquer forma, os autores afirmam que os químicos devem atingir a rastreabilidade de suas medições pelo uso de algum padrão, seja ele um material, um instrumento ou um método de referência.

O protocolo sugerido para a rastreabilidade em análise química inclui como conceitos fundamentais as definições de amostra, mensurando, medição, valor e unidade

(BIÈVRE e col., 1997a). O protocolo também aborda a realização de unidades do sistema SI e o uso de MRs para este propósito em química analítica, passando pelos conceitos de calibração e validação. Entende-se cada elo da cadeia de rastreabilidade como levando progressivamente para níveis metrológicos mais elevados até a realização da unidade SI. Outro ponto importante é que os elos da cadeia são acompanhados de suas respectivas incertezas e essas se tornam maiores conforme se afastam da ligação direta ao SI.

A utilização de métodos analíticos padronizados e validados e a implantação estrita de sistemas da qualidade, por si só não são suficientes para evitar que os resultados obtidos por um laboratório sejam incorretos e não comparáveis aos obtidos em outros laboratórios. No caso específico da análise de materiais ambientais, a complexidade das matrizes estudadas e a grande variedade de substâncias químicas, cada uma ligada à matriz de maneira diversa e sujeitas a todas as dependências e influências de organismos vivos, podem resultar em grande dificuldade em se obter resultados confiáveis. O uso de MRCs de matriz similar às amostras em estudo é forma adequada de avaliar a exatidão de métodos analíticos e o desempenho de laboratórios (ZSCHUNKE, 2000).

No entanto, apesar de sua importância na garantia da qualidade de resultados analíticos, o uso de MRCs está longe de estar difundido no Brasil. De maneira geral, a complexidade do preparo e caracterização dos MRCs faz com que o preço final seja elevado, o que pode inviabilizar economicamente seu uso. Além disso, podem existir dificuldades e restrições legais à importação de tais materiais. Finalmente, mas não menos importante, nem sempre é possível dispor de um MRC de matriz semelhante à das amostras em estudo ou com níveis de concentração da mesma ordem de grandeza.

A validação de métodos analíticos é um dos requisitos da norma ABNT NBR ISO/IEC 17025, utilizada na acreditação de sistemas de gestão da qualidade de laboratórios de ensaio (ABNT, 2006). Como o uso de MRCs é de grande importância em validação, a demanda por novos MRCs tende a aumentar, devido ao requisito da norma. Possivelmente, os produtores de MRCs bem estabelecidos não conseguirão suprir esta demanda nos próximos anos. Assim, algumas iniciativas internacionais vêm sendo realizadas com o intuito de difundir conhecimentos necessários à produção de MRs, tais como o "Treinamento sobre produção e uso de materiais de referência de laboratório para uso em controle de qualidade de rotina", TRAP-LRM, da Comissão Europeia e o "Preparo de materiais de referência e organização de rodadas de testes de proficiência", INT 1/054, organizado pela Agência Internacional de Energia Atômica, IAEA, para países em

desenvolvimento, que teve a participação do Laboratório de Análise por Ativação Neutrônica, LAN, do Centro do Reator de Pesquisa, CRPq, do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN - CNEN/SP (KRAMER e col., 2001; IAEA, 2009a).

No Brasil, a produção de MRCs ainda pode ser considerada incipiente, com exceção para a importante contribuição do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo, IPT, para MRCs da área siderúrgica (aços, ferros fundidos, metais puros, ligas de cobre, ferros-liga, refratários e minérios), e para a indústria do petróleo. Como destaque do trabalho realizado pelo IPT, há o desenvolvimento de dissertação de mestrado no Instituto de Química da Universidade de São Paulo, IQ-USP, para a certificação de MR de minério de ferro (BISPO, 2006).

Outras contribuições foram dadas pelo Centro de Tecnologia Mineral, CETEM, que tem se capacitado para a produção de MRs e produziu um MRC de bauxita em 2006 e dois MRCs para a indústria de cobre em 2007 (CETEM, 2007a, 2007b, 2007c) e pelo Instituto de Geociências da Universidade de Campinas, IG-UNICAMP, que certificou um MR de basalto, destinado a estudos geoquímicos (COTTA e ENZWEILER, 2008).

Dentro do projeto denominado “Programa Brasileiro de Metrologia em Química”, PBMQ, houve a proposta de preparo de diversos MRs, alguns para medidas físicas, e com destaque para a produção de um MRC de mercúrio em peixe pelo Laboratório de Caracterização Química e Isotópica do IPEN - CNEN/SP (PONÇANO, 2003).

Outra iniciativa brasileira no campo dos MRs é a do Laboratório de Radioisótopos do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, CENA/USP, para o preparo de um MRC de diversos elementos em café (TAGLIAFERRO e col., 2003).

Foram preparados recentemente no IPEN - CNEN/SP, MRCs com diversas razões isotópicas de urânio, resultando em tese de doutoramento. Esses MRCs são importantes, pois serão utilizados para aumentar a confiança no sistema de salvaguardas de materiais nucleares da América do Sul (OLIVEIRA JÚNIOR, 2006).

Contribuição importante para a área de MRs no Brasil foi dada pela Divisão de Metrologia Química do INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial, DQUIM/INMETRO, que se capacitou para a produção de MRs de etanol em água (SOUZA e col., 2008). Estes MRCs são utilizados na calibração de

analisadores de álcool para determinação de teor alcoólico expirado por motoristas. Além disso, o INMETRO está se capacitando para a acreditação de produtores de materiais de referência, por meio de projeto piloto disponibilizado pela Coordenação Geral de Acreditação do INMETRO, CGCRE/INMETRO (INMETRO, 2009). O projeto tem como objetivo o desenvolvimento de critérios harmonizados para os organismos avaliadores da conformidade de produtores de MRs nacionais, passo importante para a confiabilidade dos MRs produzidos no país.

O Ministério da Ciência e Tecnologia, MCT, juntamente com a Financiadora de Estudos e Projetos, FINEP, instituíram em 2007 o Sistema Brasileiro de Tecnologia, SIBRATEC, que, entre outras atribuições, tem como finalidade a criação de redes de serviços tecnológicos. Algumas das redes temáticas criadas em 2008 pretendem se capacitar para o preparo de materiais de referência tais como elementos metálicos e parâmetros físico-químicos em água, iodo em sal e urina, e alumínio em soro (FINEP, 2009).

A partir de projetos lançados em 2008, três instituições, o Centro de Pesquisa de Pecuária do Sudeste, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA, a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP, FCFRP-USP, e o CENA/USP uniram esforços com o objetivo de produzir materiais de referência e prover ensaios de proficiência sem custos aos laboratórios do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, MAPA, e demais instituições participantes do programa. O objetivo é fornecer subsídios ao desenvolvimento da agropecuária nacional, de forma a diminuir a possibilidade de barreiras técnicas ao agronegócio brasileiro (EMBRAPA, 2010; FAPESP, 2010). Os projetos visam à produção de materiais de referência de origem vegetal (farinha de soja, farelo de trigo, arroz, tomate e soja), origem animal (sangue, soro, músculo, rins, fígado) e insumos agropecuários (adubo fosfatado, forrageira, suplemento mineral). Estão previstas a certificação de elementos maiores, elementos menores e elementos traço. No momento, os estudos estão em diferentes fases de desenvolvimento e contam com a participação de alunos de mestrado e doutorado.

Em 1999, o LAN preparou um material de fígado bovino para ser utilizado como MR secundário na validação de métodos empregados na análise de alimentos e dietas. Este material foi preparado em projeto de pesquisa da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, e contou com a participação de laboratórios nacionais com experiência na análise deste tipo de material. Foi realizado um programa

interlaboratorial para a determinação das concentrações de elementos essenciais e tóxicos neste MR (MAIHARA, 2003).

Em 2009, a IAEA iniciou projeto para a capacitação de laboratórios da América Latina para o preparo e certificação de MRs (IAEA, 2009b). Para o preparo e caracterização de um MR de peixe marinho, o projeto contará ativamente com a experiência adquirida pelo LAN na área de MRs.

1.2 Mexilhões como fonte de alimento e em monitoramento ambiental

Mexilhões são moluscos bivalves da família Mytilidae, de conchas ovaladas e escuras por fora. São conhecidos no Brasil por diversos nomes populares tais como marisco, marisco das pedras, marisco preto, sururu ou ostra de pobre. Possuem aparelho circulatório aberto, tubo digestivo completo, sistema nervoso e respiração branquial. Na forma larvar apresentam vida planctônica, podendo ser transportados a grandes distâncias. O pé dos mexilhões libera secreção viscosa que, ao se solidificar, forma o bisso, fixando os animais a costões rochosos, na região da variação das marés. Estes passam então a ter vida bentônica (RIOS, 1984).

Mexilhões são economicamente importantes, pois muitas espécies são comestíveis. Constituem-se em alimento rico em proteínas, iodo, zinco e vitaminas. O cultivo de mexilhões, denominado mitilicultura, tornou-se atividade econômica importante a partir de 1940 em vários países da Europa como Espanha, França e Holanda. O mexilhão de moinho, *Mytilus galloprovincialis*, e o mexilhão europeu, *Mytilus edulis*, são as espécies mais comumente cultivadas no Atlântico Norte. Na Ásia, destaca-se o mexilhão verde, *Perna viridis*, enquanto que na América do Sul são cultivados o mexilhão do Rio da Prata, *Mytilus platensis* na Argentina e os mexilhões cholga, *Aulacomya ater*, chileno, *Mytilus chilensis* e choro *Choromytilus chorus* no Chile (LUNETTA, 2006; FAO, 2009).

O mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758) é o maior mitilídeo brasileiro, encontrado na costa atlântica da América do Sul desde a Venezuela até o Uruguai, sendo abundante no Brasil entre os estados do Rio de Janeiro e Santa Catarina. A FIG 1.1 apresenta a distribuição global de espécies de mexilhões que apresentam importância econômica (GOSLING, 2003). Observa-se que o *Perna perna* é encontrado em regiões tropicais e subtropicais do Oceano Atlântico.

FIGURA 1.1 Distribuição geográfica de espécies de mexilhão (GOSLING, 2003)

O Instituto de Pesca da Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, IP/SAA-SP, e o Centro de Biologia Marinha de São Sebastião, CEBIMar/USP, foram pioneiros na implantação da mitilicultura do *Perna perna* no Brasil, fazendo análise dos aspectos ecológicos, biológicos e socioeconômicos que influenciam o cultivo. Foi constatado que esse animal apresenta ciclo reprodutivo contínuo ao longo do ano e que pela coloração das gônadas é possível distinguir machos de fêmeas, em algumas fases do ciclo sexual.

Em geral, o mexilhão *Perna perna* atinge o tamanho comercial, ao redor de 7,0 cm, em prazo que pode variar de 10 a 12 meses. Atualmente, o estado de Santa Catarina tem posição de destaque na mitilicultura, com 93 % da produção nacional, incorporando mais de 800 produtores. No estado de São Paulo, ocorre a produção nos municípios de Caraguatatuba, São Sebastião e Ubatuba (LUNETTA, 2006).

O Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", ESALQ, também realizou estudos sobre o mapeamento da qualidade da água utilizada no cultivo e sobre a avaliação de mexilhões como alimento, relacionando aspectos microbiológicos, físico-químicos e sensoriais. Também foi estudada a viabilidade econômica da implantação de beneficiadora de mexilhões na forma de cooperativa na região de Ubatuba (FURLAN e col., 2007).

Podem-se citar várias vantagens do cultivo de mexilhões: baixo custo na implantação e retorno rápido do investimento, produção programável, pois o produtor tem conhecimento de quanto vai produzir e comercializar, obrigatoriedade de excelente qualidade da água para os cultivos, isto é, isenta de poluentes, despertando nas comunidades produtoras conscientização para a preservação ambiental.

O cultivo de mexilhões, bem como outras atividades de aquicultura, pode contribuir evitando a diminuição drástica da biomassa, fenômeno observado nos últimos anos em todo o mundo devido à exploração predatória decorrente do aumento populacional, aprimoramento das tecnologias de captura, legislação imprópria, falta de fiscalização e desorganização do setor pesqueiro (PEREIRA e col., s. d.).

Por outro lado, a aquicultura, um dos setores de produção de alimentos que mais cresce no mundo, tem sido alvo de preocupação devido aos impactos que podem ocorrer, incluindo liberação de efluentes que levam a degradação da qualidade das águas (eutrofização, marés vermelhas, níveis baixos de oxigênio dissolvido) e a acúmulo de sedimentos ricos em matéria orgânica; alteração ou destruição de habitats naturais, principalmente manguezais; aumento da competição pelo uso de água potável; uso abusivo de produtos químicos, com implicações ambientais; introdução e transmissão de doenças de animais aquáticos; impactos nos recursos pesqueiros naturais devido à coleta de sementes; riscos à biodiversidade pelo uso de espécies não nativas e pela domesticação de espécies nativas. De qualquer modo, de acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, FAO, têm ocorrido avanços de forma a se evitarem esses problemas para a garantia da sustentabilidade do setor (FAO, 2006). Além disso, considera-se a cultura de moluscos pouco agressiva do ponto de vista ambiental, por utilizar nutrientes naturalmente existentes nas águas.

Na TAB 1.1 são apresentados dados selecionados para alguns países da produção mundial de mexilhões, para período de dez anos (FAO, 2009). Pode-se observar que o cultivo de mexilhões vem crescendo ano a ano em todo o mundo e que para a maioria dos países o cultivo é maior que a captura. Muitos países também apresentam tendência em diminuir a quantidade de mexilhões capturada, vindo a suprimi-la, como no caso australiano. Isto pode estar relacionado à diminuição dos bancos naturais de mexilhões, mas também às legislações mais restritivas para a captura. Por outro lado, alguns países como a Venezuela, apresentam grande crescimento na captura e possuem cultivo incipiente.

Os mexilhões são organismos sedentários, que se alimentam por filtração da água. Cílios presentes nos filamentos das brânquias são responsáveis por levar a água para o interior da cavidade do manto e posteriormente retirá-la. O plâncton presente na água é filtrado, sendo o alimento dos mexilhões. Diversos fatores influenciam a taxa de filtração, tais como a espécie, o tamanho do organismo, a temperatura, a salinidade e a qualidade e quantidade dos alimentos. Estima-se que os mexilhões possuam capacidade de filtrar de 15 a 40 litros de água por hora. Dessa forma, estão em contato próximo com a água e, como consequência, podem vir a acumular em seus tecidos diversos poluentes. Há evidências de acumulação de pesticidas, elementos tóxicos e hidrocarbonetos provenientes de águas contaminadas, com efeitos graves na fisiologia e no sistema imunológico dos bivalves. Os efeitos de diversos poluentes e em particular de elementos tóxicos em mexilhões está fora do escopo deste trabalho, mas vale citar que diversas metaloproteínas, enzimas antioxidantes e sequestradores de oxirradicais foram detectados em grande quantidade nas glândulas digestivas dos animais, de forma a protegê-los dos efeitos de contaminantes (GOSLING, 2003). Se por um lado o acúmulo de contaminantes pode trazer prejuízos à mitilicultura, por outro lado, pode ser aproveitado no monitoramento da qualidade das águas (FURLAN e col., 2007).

TABELA 1.1 Produção mundial de mexilhões, em toneladas por ano (FAO, 2009)

País	Método	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
Austrália	Cultivo	1482	1928	2017	2509	2789	2727	2628	2900	3189	3145
	Captura	1	1	1	3	2	1	0	0	0	0
Brasil	Cultivo	7749	9510	11760	11080	9067	8608	10380	12775	12083	12002
	Captura	1230	906	802	926	651	1137	1400	2654	2338	1348
Chile	Cultivo	12584	17246	23996	35446	43753	57415	744506	82860	125172	150606
	Captura	12751	9624	11016	14808	5282	6213	3215	2060	3421	3155
Coreia	Cultivo	17785	15042	11713	13653	13201	15785	20409	43953	81617	98121
	Captura	7925	8185	6928	4913	4426	3260	3059	4177	1184	1620
Espanha	Cultivo	261062	261964	247730	245985	193386	205636	231633	158166	228830	209633
	Captura	84	46	18	57	77	16	19	30	10	38
França	Cultivo	61500	62500	68000	73220	68698	64650	67780	71220	71698	77760
	Captura	2433	9587	10476	8619	4303	1400	1447	5071	6026	3122
Venezuela	Cultivo	0	0	10	10	0	0	0	0	0	0
	Captura	3802	451	316	1081	1271	2712	2712 ^a	2712 ^a	2712 ^a	2712 ^a

^a valores estimados

O monitoramento ambiental tem como objetivo determinar tanto as concentrações naturais dos constituintes químicos quanto a concentração de poluentes no meio ambiente. A intensa atividade humana como mineração, queima de combustíveis fósseis, processamento industrial, agropecuária, liberação de efluentes domésticos e atividades nucleares, contribui para a poluição do meio ambiente aquático. Muitos contaminantes causam efeitos drásticos devido à sua biodisponibilidade e toxicidade em processos biológicos (KAYASTH e SWAIN, 2004).

Em todo o mundo, programas nacionais e internacionais de monitoramento ambiental foram iniciados para avaliar a qualidade do ambiente aquático. Esse pode ser avaliado pela análise da água do mar. No entanto, isso não é considerado suficiente, pois a análise de amostras de água fornece resultados apenas para um dado lugar em um determinado tempo. Além disso, trata-se de matriz de análise complexa, pois esta possui sais dissolvidos em quantidades elevadas, como cloreto de sódio, o que dificulta a análise de poluentes em teores muito baixos. Pela análise de organismos marinhos, pode-se avaliar a poluição por um longo período de tempo, incluindo picos de concentração e seus efeitos na absorção biológica. Assim, esses organismos funcionam como "amostradores biológicos".

As técnicas de biomonitoramento medem a toxicidade agregada de todos os constituintes em um efluente complexo; os efeitos tóxicos podem ser controlados pela limitação de um único parâmetro – a toxicidade do efluente; a biodisponibilidade dos constituintes tóxicos é avaliada; e os efeitos de interações são determinados. O ideal é que análises químicas apropriadas sejam realizadas na água, sedimento e tecidos dos organismos, para que seja possível estabelecer com precisão as relações de concentração e resposta para diferentes organismos ou examinar diferenças no destino e transporte, além das taxas de biodegradação, biotransformação e bioacumulação de contaminantes (PRÓSPERI e NASCIMENTO, 2006).

O monitoramento de águas doce e de mar com animais aquáticos envolve também análises de mexilhões, ostras e mariscos e é feita em mais de setenta países (MARKERT e col., 1999). É essencial garantir que os dados produzidos sejam suficientemente exatos, pois esta é a única forma de garantir que os resultados obtidos por diferentes laboratórios em intervalos longos de tempo sejam comparáveis. Para se verificar a presença e magnitude de poluentes e seus subprodutos no ambiente, é necessário que se utilizem técnicas analíticas exatas, mas que também seja dada atenção a todos os aspectos

da sequência analítica, desde a amostragem e preparo da amostra até a utilização de programas de controle de qualidade dos métodos analíticos. Daí a importância da disponibilidade de MRCs de organismos marinhos, em particular de mexilhão, na validação dos métodos utilizados nas análises de biomonitoramento.

A utilização de organismos marinhos, como indicadores de aportes ao meio ambiente de substâncias tóxicas de origem antrópica, tem sido objeto de estudo em diversos trabalhos no Brasil (CALLIL, 1998; MEDEIROS e col., 1998; PEREIRA e col., 2002). Desde 2002, o LAN desenvolve projetos de pesquisa de biomonitoramento ambiental, em colaboração com o Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, IO-USP, junto ao Laboratório de Ecotoxicologia, visando monitorar a contaminação de algumas regiões do litoral do estado de São Paulo, utilizando mexilhões *Perna perna* transplantados. Utiliza-se a determinação de elementos tóxicos como arsênio, cádmio, chumbo e mercúrio e análises ecotoxicológicas tais como o ensaio de tempo de retenção do corante Vermelho Neutro e o teste embriolarval, com o intuito de formar panorama ecotoxicológico integrado. Este trabalho já resultou em duas teses de doutoramento, uma no IPEN - CNEN/SP e outra no IO-USP (SEMMLER, 2007; PEREIRA, 2008).

1.3 Proposta de preparo e caracterização de um material de referência de mexilhão

Do exposto nos itens acima, fica evidente a relevância do preparo de um MRC de mexilhão, de forma a possibilitar impulso à mitilicultura nacional e auxiliar no monitoramento da qualidade de nossas águas e no controle da poluição marinha.

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento das etapas necessárias para a produção de um MR de mexilhão. Foi efetuada a caracterização do material, com a determinação de alguns constituintes principais, isto é, elementos que ocorrem na faixa de porcentagem em massa, tais como Ca, Cl, K, Mg, e Na, e de elementos que ocorrem como traços, isto é, com concentração na ordem de mg kg^{-1} , tais como As, Br, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, I, Pb, Fe, Se, Zn.

Os métodos de Análise por Ativação Neutrônica, NAA, e Espectrometria de Absorção Atômica, AAS, disponíveis no LAN foram utilizados para a caracterização do MR de mexilhão. Além disso, foram avaliados os diversos componentes de incerteza associados às técnicas para se obter a incerteza de medição relacionada aos resultados

obtidos (ABNT/INMETRO/SBM, 2003; EURACHEM/CITAC, 2000; MOREIRA e col., 2006).

Foi realizado programa colaborativo visando a certificação do MR, com a participação de laboratórios nacionais e internacionais e seguindo-se protocolos estabelecidos para a avaliação estatística dos resultados do programa e atribuição dos valores de propriedade e incertezas associadas (ABNT, 1999a, 1999b; THOMPSON e col., 2006; ISO, 2010).

2 CONSIDERAÇÕES SOBRE O PREPARO E A CARACTERIZAÇÃO

Neste capítulo são feitas considerações sobre as abordagens necessárias para o preparo de materiais de referência biológicos, bem como avaliação sobre as etapas de caracterização e sobre o arcabouço teórico utilizado neste trabalho para a análise dos resultados obtidos experimentalmente.

2.1 Panorama sobre a produção de materiais de referência biológicos marinhos

Alguns organismos internacionais possuem ampla experiência no preparo e certificação de MRCs de diversas matrizes para estudos oceânicos, tais como água marinha, sedimentos, moluscos e algas. O Conselho Nacional de Pesquisa do Canadá, NRCC, é produtor de MRCs para toxinas em mariscos e de elementos traço em músculo e fígado de cação (NRCC 1999, 2002). Já o Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia dos Estados Unidos da América, NIST, produziu grande número de MRs, certificados para contaminantes orgânicos e elementos traço em organismos marinhos, tais como mexilhões e ostras (NIST, 2000b, 2001), enquanto que o Instituto para Materiais de Referência e Medições, IRMM, da União Europeia, preparou MRCs para elementos traço em mexilhão (IRMM, 2004). A IAEA tem ampla experiência na produção de MRCs para estudos ambientais, tais como contaminantes orgânicos e espécies de mercúrio em mexilhão (HORVART e col., 1997) e radionuclídeos em diversas matrizes de origem marinha (POVINEC e PHAM, 2001).

Em seu interessante e autobiográfico trabalho, Becker cita os desafios para o preparo e caracterização dos primeiros MRCs de matriz biológica: folhas de pomar (NBS SRM 1571, *orchard leaves*), que teve início em 1965 e emissão do primeiro certificado em 1971 e fígado bovino (NBS SRM 1577, *bovine liver*), preparado e caracterizado entre 1971 e 1972, na Divisão de Química da então Agência Nacional de Padrões dos Estados Unidos da América, NBS (BECKER, 2006). A partir daquela época, diversos avanços foram introduzidos, com destaque para a moagem por jato de ar (*jet milling*) que produz materiais com granulometria muito mais fina do que nos processos

usuais de moagem, levando à melhor homogeneidade. Além disso, o autor comenta sobre os aspectos fundamentais de garantia e avaliação da qualidade, bem como sobre a importância do conhecimento das fontes de incerteza dos métodos analíticos, de forma a se obter MRs com caracterização a mais exata possível. Finalmente, o autor descreve o papel da utilização de métodos nucleares, em particular dos avanços obtidos na NAA, como muito importantes na caracterização de novos MRs.

Os anais dos diversos simpósios sobre Materiais de Referência Ambientais e Biológicos, BERM, foram utilizados para se formar panorama das tendências mundiais na área de MRs, com intuito de fornecer subsídios para as áreas da saúde, da nutrição e de controle ambiental (IYENGAR e WOLF, 1998). Inicialmente, nas primeiras edições do BERM, a ênfase foi dada na certificação de constituintes inorgânicos em alimentos e amostras ambientais e, posteriormente, outros aspectos de certificação foram sendo tratados, tais como determinação de nutrientes orgânicos em alimentos, materiais voltados para medições bioquímicas, fluidos do corpo humano, segurança alimentar (micotoxinas), química ambiental, incluindo materiais marinhos, aspectos específicos da área de nutrição (ácidos graxos, fibras dietéticas, vitaminas, açúcares, gorduras totais e colesterol), especiação química, medição de radioatividade natural e a devida à precipitação radioativa¹, microbiologia e biotecnologia. Nas últimas edições do simpósio foram abordadas questões relacionadas ao uso de MRs em rastreabilidade de medições, definição formal de MRs primários e secundários e o uso de MRs para a obtenção de qualidade em química analítica.

No que se refere às necessidades de países em desenvolvimento, as edições do simpósio têm verificado, com poucas exceções, que esses ainda enfrentam limitações em seus esforços para a introdução de níveis de garantia da qualidade sustentáveis nos seus programas analíticos. No caso dos MRs, os recursos para a aquisição destes são escassos, nem sempre os MRs disponíveis são adequados aos problemas enfrentados e há falta de conhecimento para o preparo de MRs secundários pelos próprios laboratórios. De acordo com os autores, a solução para esses problemas não é simples, pois passa por questões de economia nacional, educação, treinamento e de estatutos regulatórios que exijam o controle de qualidade analítica como requisito (IYENGAR e WOLF, 1998).

Em sua última edição, de número 12, as sessões plenárias do BERM enfocaram:

¹ Geralmente utiliza-se o termo em inglês *fallout* para se referir à precipitação radioativa, que consiste na contaminação radioativa após explosão nuclear que se precipita a partir da atmosfera.

- a necessidade de padronização internacional no que se refere a materiais de referência, em particular a adequação dos guias para acreditação de produtores de MRs aos princípios metroológicos contidos na edição mais recente do Vocabulário Internacional de Metrologia, VIM (BOTHÁ e col., 2009; WALSH, 2009; JCGM, 2008);
- as expectativas em relação a MRs no que se refere à conformidade às legislações vigentes; influência na saúde, qualidade de vida e comércio internacional; segurança alimentar; controle de processos industriais; proteção ambiental; e o impacto destes em medição, no que se refere a desenvolvimento e calibração de métodos e validação (avaliação de exatidão e estimativa de incertezas). Considerou-se que os MRs também têm papel de destaque como prova do desempenho de métodos analíticos (controle de qualidade interno de laboratórios e avaliação de operadores e equipamentos) e em testes de proficiência, como treinamento e verificação da competência de laboratórios (EMONS, 2009).

No que se refere aos desafios e tendências na área de MRs, nesta edição do BERM o destaque foi para novos MRs para caracterização de anticorpos, nanomateriais e materiais geneticamente modificados; MRs para determinação de amostras sólidas por Micro Fluorescência de Raios X, μ -XRF, e Espectrometria de Massa com Fonte de Plasma Indutivamente Acoplado e Abrasão Superficial por Laser, LA ICP-MS, e finalmente MR para análise de sistemas biológicos, resíduos eletrônicos e poluentes emergentes (PANNE, 2009).

Como já mencionado, há grande diversidade de propriedades de interesse para certificação em MRs de matriz biológica, tais como elementos químicos, poluentes orgânicos, radionuclídeos naturais e os provenientes de testes nucleares, toxinas ou microorganismos. Eventualmente, as técnicas de preparo do material podem variar muito dependendo das propriedades de interesse.

Em levantamento efetuado no banco de dados internacional de MRCs foram localizados 32 MRCs biológicos de origem marinha, descritos na TAB 2.1. Há informações para a concentração de 60 elementos, além de dados de especiação de oito compostos organometálicos de interesse ambiental, conforme apresentado na TAB 2.2 (COMAR, 2007). É importante ressaltar que não é reportada a certificação de todos os elementos para todos os MRCs, sendo grande parte dos resultados apresentados apenas como valores informativos. Além disso, nem todos os MRCs descritos no banco de dados ainda estão disponíveis para comercialização.

A escolha dos elementos a serem certificados depende de diversos fatores tais como o uso pretendido do material e a importância da determinação do elemento devido a sua toxicidade ou valor nutricional. Porém, a disponibilidade de técnicas analíticas suficientemente bem validadas, capazes de produzir resultados com incertezas associadas aceitáveis, em um número razoável de laboratórios bem como questões econômicas são fatores que limitam o número de elementos que são determinados e certificados em uma campanha de certificação.

TABELA 2.1 Materiais de referência biológicos de origem marinha identificados no banco de dados internacional de MRCs (COMAR, 2007)

MRC	Nome (no original em inglês ou espanhol)	Código
1	Oyster tissue	NIST SRM 1566b
2	Organics in mussel tissue (<i>Mytilus edulis</i>)	NIST SRM 1974a
3	Organics in mussel tissue (<i>Mytilus edulis</i>)	NIST SRM 1974b
4	Organics in freeze-dried mussel tissue (<i>Mytilus edulis</i>)	NIST SRM 2974
5	Mussel tissue (trace elements and methylmercury)	NIST SRM 2976
6	Mussel tissue (organic contaminants and trace elements)	NIST SRM 2977
7	Mussel tissue (organic contaminants - Raritan Bay, Ney Jersey)	NIST SRM 2978
8	Dogfish muscle certified reference material for trace metals	DORM-1
9	Dogfish liver certified reference material for trace metals	DOLT-1
10	Dogfish muscle certified reference material for trace metals	DORM-2
11	Dogfish liver certified reference material for trace metals	DOLT-3
12	Lobster hepatopancreas reference material certified for trace metals and other elements	TORT-1
13	Lobster hepatopancreas reference material for trace metals	TORT-2
14	Non defatted lobster hepatopancreas reference material for trace metals	LUTS-1
15	Trace elements in plankton	BCR-414
16	Trace elements in cod muscle	BCR-422
17	Total and methyl Mercury in tuna fish	BCR-463
18	Total and methyl Mercury in tuna fish	BCR-464
19	Forms of arsenic in tuna fish tissue	BCR-627
20	Mussel tissue	BCR-668
21	Mussel tissue	ERM - CE278
22	Tuna fish	ERM - CE464
23	Mussel tissue	ERM - CE477
24	Mussel homogenate	IAEA-142
25	Trace elements and methylmercury in fish tissue	IAEA-407
26	Trace elements and methylmercury in tuna fish	IAEA-436
27	Elementos em almeja (<i>Venus antiqua</i>)	MR-CCHEN-002
28	Fish tissue	NIES CRM No 11
29	Trace elements, arsenobetaine and methylmercury in cod fish tissue	NMIJ CRM 7402a
30	Oyster Tissue Powder	KRISS 108-04-001
31	Prawn for use in environmental chemical analysis and food chemical analysis	GBW 08572
32	Crab paste certified for heavy metals and nutrient metals	LGC7160

TABELA 2.2 Analitos caracterizados em MR biológicos marinhos (COMAR, 2007)

Analito/MR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
Ag	X	X	X	X	X	X				X	X														X	X						
Al	X	X		X	X	X				X	X				X										X	X	X		X		X	X
As	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X				X	X	X		X		X	X
Au				X		X																										
B	X																															
BA	X					X									X	X										X					X	
Br		X		X	X	X									X	X									X	X	X				X	
C															X																	
Ca	X				X	X						X		X	X	X									X	X	X		X		X	X
Cd	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X					X	X				X	X	X		X	X	X	X
Cl	X	X		X	X	X		X	X																							
Co	X	X		X	X	X		X	X	X	X			X	X	X				X					X	X	X		X		X	X
Cr		X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X				X	X	X		X	X	X	X
Cs		X		X		X									X					X						X						
Cu	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X					X				X	X	X		X	X	X	X
Fe	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X									X	X	X		X	X	X	
H	X																															
Hf		X		X																												
Hg	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X		X	X	X	X			X	X		X	X	X			X		X	X
CH ₃ Hg ⁺	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X			X	X	X			X	X		X	X	X			X			
I						X										X																
K	X	X		X	X	X		X	X			X		X	X	X									X	X	X		X		X	X
Li																									X	X						
Mg	X	X		X	X	X		X	X			X		X	X	X									X	X	X					
Mn	X	X		X	X	X		X	X	X		X	X	X	X	X									X	X			X		X	X
Mo												X	X		X					X									X		X	X
N	X	X													X																	
Na	X	X		X	X	X		X	X			X			X	X									X	X	X		X		X	X
Ni	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X										X	X	X		X			X
P					X	X						X			X	X																
Pb		X	X	X	X	X		X	X	X	X		X		X	X				X					X	X	X		X	X	X	X
Rb	X				X	X						X			X	X									X	X	X					
S	X				X	X									X	X														X		
Sb	X	X		X		X									X	X									X				X			
Sc		X		X	X	X									X					X							X					
Se	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X					X				X	X	X		X		X	X

TABELA 2.2 Analitos caracterizados em MR biológicos marinhos (COMAR, 2007) - continuação

Analito/MR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
Sn	X	X		X	X	X				X	X	X	X	X	X										X	X		X				
Sr	X	X		X	X	X					X	X			X	X									X	X	X		X		X	X
Ta		X		X	X																											
Th	X	X		X	X	X														X										X		
Ti															X																	
Tl						X			X						X															X		
U	X					X									X					X												
V	X	X		X		X					X	X			X	X									X	X	X					X
Zn	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X		X	X	X				X	X				X	X	X		X		X	X
Ce		X		X	X	X														X							X					
Dy																				X												
Er																				X												
Eu		X		X	X															X							X					
Gd		X																		X												
Ho																				X												
La		X		X		X									X					X							X					
Lu																				X												
Nd																				X												
Pr																				X												
Sm		X		X		X														X												
Tb																				X												
Tm																				X												
Y																				X												
Yb																				X												
Arsenobetaina									X											X												
Ácido dimetilarsínico																				X												
Tetrametilarsônio									X														X									
Monobutilestanho																							X									
Dibutilestanho																							X									
Tributilestanho																												X				
Trifenilestanho																												X				

2.2 Preparo do material de referência de mexilhão

A Organização Internacional para Padronização, ISO, apresenta a sistemática para a produção de MRCs nos Guias da série 30 a 35, desde a descrição formal de termos e definições relacionados ao tema, até o processo de certificação, passando pelas competências do produtor (ABNT, 2000a, 2000b, 2002, 2004a; 2004b; ISO, 2006). As recomendações desses guias foram seguidas, de forma a se obter um MR aceitável do ponto de vista metrológico.

Neste estudo foram desenvolvidas todas as etapas necessárias para a produção de um material de referência de mexilhão. De modo geral, as etapas dependem das características do material, da concentração e natureza dos analitos e da quantidade e número de unidades do MRC previstos. As diversas etapas foram definidas a partir da experiência do LAN na manipulação de materiais biológicos e em amostragem, no que se refere aos cuidados para se evitar contaminações por elementos traço que serão quantificados nas amostras e nos cuidados para se evitar a perda de analitos. Além disso, relatórios detalhados sobre a produção de diversos MRCs de mexilhão internacionais foram avaliados (KRAMER e col., 2001; EC, 1998, 2001; NIST, 1997, 1998, 1999, 2000a, 2000b, 2001, 2003).

A amostragem de mexilhões deve ser preferencialmente de uma única população, com o mesmo tamanho (idade), localização e tempo (mesmo histórico de poluição). O uso de mexilhões cultivados (de maricultura) apresenta diversas vantagens: são todos da mesma população, do mesmo tamanho e foram expostos à mesma água e alimentação. O uso de mexilhões cultivados proporciona melhor homogeneidade do produto e, além disso, a coleta é fácil e usualmente a um preço razoável. Deste modo, o uso de mexilhões adquiridos em mercados ou feiras não é recomendado, pois praticamente não há histórico algum, mesmo quando a origem é indicada. Além disso, não se podem excluir contaminações.

Após a coleta o material é armazenado em freezer até o processamento. Este consiste na retirada do tecido mole das conchas e homogeneização dos tecidos em liquidificador. Após essa etapa, o material é seco por liofilização. A liofilização é preferida a métodos térmicos de secagem pois retira água do material sem alterar significativamente suas propriedades químicas e sem a possibilidade de perdas de analitos. Após a liofilização, o material deve ser moído e o tamanho das partículas ajustado. O controle do tamanho de partículas é importante, pois pode influenciar na homogeneidade do lote. O

teor de umidade residual no material liofilizado deve ser controlado. Após a homogeneização do material moído, esse deve ser envasado e irradiado com raios gama para esterilização, com intuito de evitar degradação microbiológica. A caracterização dos elementos de interesse no material consiste, inicialmente, na avaliação da heterogeneidade residual do material, na avaliação da estabilidade a curto e a longo prazo e, finalmente, na realização de programa colaborativo com a participação de diversos laboratórios, capacitados para a determinação dos elementos de interesse.

Durante o processamento, deve-se impedir o contato do material com superfícies metálicas para evitar possíveis contaminações com elementos metálicos, principalmente os advindos do aço inoxidável. Utiliza-se lâminas de titânio pois esse metal pode ser obtido com alto grau de pureza e, em geral, por não apresentar interesse analítico.

São apresentadas na FIG 2.1 as diversas etapas para a produção do material de referência de mexilhão. Essas etapas serão abordadas em detalhe em itens posteriores deste estudo.

FIGURA 2.1 Etapas do preparo do material de referência de mexilhão

2.3 Caracterização do material de referência de mexilhão

Abordam-se neste item os diversos aspectos envolvidos na caracterização do material de referência de mexilhão.

2.3.1 Processo de esterilização com radiação gama

Há mais de quarenta anos, a irradiação com radiação gama é utilizada em todo o mundo para preservação e melhora da qualidade microbiológica de alimentos, com benefícios econômicos e na área da saúde. Trata-se de tecnologia bem estabelecida e cujo objetivo é reduzir grandemente ou eliminar microorganismos que possam causar a degradação dos alimentos ou que sejam patogênicos, sem, no entanto, introduzir mudanças sensoriais nos produtos (FARKAS, 1998; MOLINS, 2001). A inativação de

microorganismos ocorre por danos em elementos críticos das células, frequentemente no material genético, levando à morte celular (DICKSON, 2001). Além disso, a sensibilidade à radiação depende da espécie em questão e de fatores tais como teor de água e temperatura.

Anteriormente à irradiação do lote de mexilhões, buscou-se verificar na literatura qual seria a dose mais adequada de irradiação para garantir a estabilidade do material durante seu tempo de validade, mas que não degradasse suas propriedades. No entanto, a única informação disponível nos relatórios de certificação consultados é que o material havia sido irradiado com radiação gama. Somente o relatório do material de referência de ostra NIST SRM 1566b, que foi certificado para diversos elementos e para metil mercúrio, informa a dose de 30 kGy (NIST, 2001).

As recomendações internacionais para irradiação de alimentos são restritivas no que se refere à dose total aplicada, uma vez que a utilização de doses mais elevadas pode levar à degradação de nutrientes e a alterações organolépticas dos alimentos (THAYER e col., 1996). Por outro lado, foi demonstrado que a utilização de doses maiores que 10 kGy não levaria a mudanças na composição de alimentos que, do ponto de vista toxicológico, causaria efeitos adversos à saúde humana (WHO, 1999). As mudanças químicas que ocorrem nos alimentos irradiados são devidas ao resultado da ação direta da radiação nos carboidratos, proteínas, gorduras e outros compostos presentes no alimento e também pelo efeito dos intermediários reativos formados durante a radiólise da água. Os minerais presentes nos alimentos não têm sua composição afetada (STEWART, 2001). No entanto, como o metil mercúrio é um analito de interesse neste projeto, optou-se por utilizar a dose mais baixa possível, para evitar a degradação deste, sem comprometimento da estabilidade da matriz do material.

Foram encontrados na literatura dois estudos sobre a degradação por radiação gama de analitos na forma de organometálicos em materiais de referência. Os produtores do material de referência de cabelo humano NIES CRM No. 13 informaram que o material não foi irradiado para evitar a decomposição do metil mercúrio, principal analito de interesse neste material. Esse MRC deve ser armazenado a -20 °C e no escuro (YOSHINAGA e col., 1997). Esta opção é aceitável para cabelo, matriz biológica bastante estável. Já para o material de referência de sedimento marinho NRCC CRM PACS-2, certificado para espécies orgânicas de estanho, observou-se que, ainda que soluções metanólicas das espécies de estanho fossem muito degradadas a estanho inorgânico pela

radiação gama, a degradação foi bem menor para sedimentos fortificados com estas espécies e, portanto, a matriz do sedimento teria agido como barreira à degradação pela radiação gama (YANG e col. 2003).

Neste trabalho, optou-se por avaliar a atividade microbiológica do candidato a material de referência de mexilhão em função da dose de irradiação, para se definir a melhor dose, sem dano às propriedades de interesse no material, em particular, ao teor de metil mercúrio.

2.3.2 Determinação de umidade residual

Materiais de referência biológicos liofilizados tendem a ser higroscópicos. Assim, é importante que o produtor informe aos usuários a umidade residual presente no momento do envase. A umidade residual deve ser inferior a 4 %, pois estudos comprovam que a atividade microbiológica é bastante restrita abaixo desse valor (FARKAS, 1998). Além disso, o produtor deve informar o método apropriado para a determinação da umidade residual no material, para que os usuários possam obter resultados expressos em massa seca, comparáveis com os valores certificados.

Para se verificar a melhor temperatura de secagem do material e se obter valor de referência representativo de todo o lote, utilizou-se para a determinação de umidade a termogravimetria, TG, e a determinação de umidade por secagem em estufa.

Como complementação ao estudo do teor de umidade, optou-se por realizar a determinação de água total na amostra pelo método de Karl Fischer. O método de titulação por Karl Fischer baseia-se na oxidação de dióxido de enxofre por iodo, em solução metanólica na presença de água (METTLER-TOLEDO, 2002).

Além da umidade, atualmente outros fatores são considerados importantes para a estabilidade de um MR. Conhecimentos sobre cinética de sorção, equilíbrio de umidade, interações de energia entre a água e a superfície dos MRs, a influência dos níveis de atividade de água e das monocamadas de água de BET (Brunnauer-Emmett-Teller) estão se tornando cada vez mais importantes para a produção e uso de MRs (ZEILLER e col., 2007). O estudo desses fatores está fora do escopo deste trabalho.

Para haver estabilidade no armazenamento, os níveis de atividade de água² devem estar entre 0,2 a 0,4. A ideia é que grupos polares na superfície são saturados com água e protegem contra a degradação, por exemplo, contra a auto-oxidação de lipídeos (ZEILLER e col., 2007).

2.3.3 Caracterização granulométrica

Distribuições de partículas dentro de uma faixa estreita são preferidas para MRs, uma vez que tamanhos de partícula diferentes em um frasco de MR podem levar à segregação do material, interferindo na homogeneidade (KRAMER, e col., 2001). O problema é crítico para MRs de matriz metálica ou geológica, nos quais a existência de partículas e agregados com fases diferentes é possível. O problema é menos crítico no caso de MRs de origem biológica, mas ainda assim, deve-se realizar a caracterização da granulometria para garantir que os MRs sejam preparados com homogeneidade adequada.

Além da utilização de peneiras com diversas granulometrias, optou-se por utilizar analisador de partículas por difração de laser para a caracterização da distribuição granulométrica do candidato a MR de mexilhão.

A caracterização granulométrica de pós, efetuada pela técnica de difração de laser, parte do princípio de que o padrão de espalhamento da luz, formada no detector, é a soma dos espalhamentos produzidos por cada partícula amostrada (KIPPAX, 2005). A deconvolução do padrão resultante fornece informações sobre o tamanho das partículas. A técnica apresenta como vantagens a rapidez da análise, facilidade de uso e preparo de amostra relativamente simples. Como limitações, o desempenho depende muito das características ópticas do equipamento; a técnica não distingue partículas de aglomerados e erros significativos podem ser obtidos caso o formato das partículas apresentem desvio muito grande da forma esférica (JILLAVENKATESA e col., 2001).

² A atividade de água é definida como a razão entre a pressão do vapor de água sobre a amostra e a pressão do vapor de água pura.

2.3.4 Caracterização dos elementos de interesse

A caracterização dos elementos de interesse no candidato a MR de mexilhão consiste, inicialmente, na avaliação da heterogeneidade residual do material, na avaliação da estabilidade a curto e a longo prazo e, finalmente, na realização de programa colaborativo, com a participação de diversos laboratórios capacitados, para a determinação dos elementos.

2.3.4.1 Estudo de homogeneidade

Materiais de referência sólidos são, em princípio, heterogêneos. Portanto, devem-se tomar todas as medidas para tornar a heterogeneidade a menor possível durante o processo de fabricação. Na prática, o estudo de homogeneidade é utilizado para se verificar se a diferença observada entre os diversos frascos do lote do material, isto é, a heterogeneidade residual, é significativa se comparada com a incerteza da caracterização do material (ISO, 2006). O principal teste de homogeneidade é o estudo de homogeneidade entre frascos, o qual é utilizado para se garantir que não há variação nas propriedades de interesse ao longo do lote de frascos do material, sendo também utilizado na estimativa da contribuição da heterogeneidade residual para a incerteza dos valores certificados. A incerteza do valor certificado devida à heterogeneidade residual deve ser pequena ou desprezível se comparada às devidas à estabilidade e à caracterização propriamente dita do material. Também é realizado o estudo de homogeneidade dentro do frasco. Neste caso, ao se utilizar massas diferentes de amostra, pode-se determinar a massa mínima de amostra necessária para determinada aplicação.

A utilização de pequena massa de amostra, sem necessidade de dissolução e consequentemente com pouca preocupação com problemas de brancos, contaminação, perdas ou rendimento, torna a Análise por Ativação Neutrônica Instrumental, INAA, técnica de referência para a avaliação do grau de homogeneidade de MRs (ROSSBACH e GROBECKER, 1999; TIAN e col., 2002).

Frequentemente utiliza-se a técnica estatística de Análise de Variância, ANOVA, para determinar a variabilidade tanto entre frascos como dentro do frasco. Essa foi a abordagem seguida neste estudo.

2.2.4.2 Estudo de estabilidade

MRCs biológicos estão sujeitos à degradação ou perda de analitos ao longo do tempo. O produtor do material deve informar aos consumidores as melhores condições de armazenamento e garantir a estabilidade do material durante o tempo de validade do certificado. Dois tipos de estabilidade devem ser investigados na certificação do MR: a estabilidade a curto prazo, que simula as condições de transporte do material, para se verificar se este pode ser levado do produtor aos consumidores em condições normais de transporte e a estabilidade a longo prazo, com a qual se pode estimar o tempo de prateleira do MRC (ISO, 2006).

No estudo de estabilidade, o candidato a MRC é exposto a condições que provavelmente irão acelerar a degradação ou transformação da matriz ou dos analitos. A temperatura é um dos fatores primordiais no processo de degradação. Deste modo, alguns frascos do candidato a MRC são armazenados em temperaturas diferentes e analisados em função do tempo para cada temperatura para se verificar possíveis mudanças na concentração dos analitos de interesse.

No estudo de estabilidade a curto prazo a amostra é submetida a temperaturas extremas, simulando-se as condições de transporte do MRC do produtor ao consumidor. Em geral o estudo é efetuado por dois meses, em aproximadamente três temperaturas além da temperatura de armazenamento. A partir dos resultados obtidos, pode-se chegar a recomendações sobre o transporte do material (ISO, 2006).

No estudo de estabilidade a longo prazo, utiliza-se a temperatura na qual o produtor pretende armazenar o MRC, sendo a amostragem dos frascos realizada até se completar um ano ou mais. A partir dos resultados do estudo de estabilidade a longo prazo é possível estimar o tempo de prateleira para o MRC.

Para que o estudo de estabilidade apresente resultados em condições mais próximas às condições de repetitividade, isto é, determinações realizadas em curto espaço de tempo, utilizando-se os mesmos equipamentos, operadores e condição de calibração de equipamentos, optou-se por empregar o estudo isócrono de estabilidade, em contraste ao projeto clássico de estudo de estabilidade (LAMBERTY, e col. 1997). Deve-se observar que, ainda que no estudo isócrono as amostras sejam analisadas somente no final do processo, há a vantagem de se obter resultados com nível maior de repetitividade. Na Parte

Experimental deste trabalho, são detalhadas as condições empregadas para os estudos de estabilidade realizados para o candidato a material de referência de mexilhão.

A técnica de ANOVA também foi utilizada para a avaliação dos resultados obtidos nos estudos de estabilidade realizados.

2.2.4.3 Programa colaborativo para certificação

Para a atribuição dos valores de propriedade de um material de referência, diversas abordagens são possíveis, empregando uma ou mais técnicas em um ou mais laboratórios. Cada abordagem apresenta pontos fortes e pontos fracos. A abordagem apropriada depende do tipo de MR, do seu uso pretendido, da qualificação dos laboratórios envolvidos, da qualidade do método ou dos métodos e da habilidade em se estimar a incerteza associada ao valor de propriedade (ISO, 2006).

O ABNT ISO Guia 34 define quatro abordagens para a caracterização dos valores de propriedade: medição por meio de um método (primário)³ único em um laboratório único; 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; abordagem com método específico que fornece apenas os valores de propriedade específicos do método, utilizando uma rede de laboratórios (ABNT, 2004b).

De acordo com o guia, a primeira abordagem não é adequada para MRCs de matriz, já que há os riscos de se perder efeitos de matriz ou de ocorrerem interferências. Para esses casos, o guia recomenda pelo menos dois resultados independentes de métodos primários obtidos por grupos diferentes. Por outro lado, instituições com elevado grau de qualidade e confiança em seus resultados analíticos, como o NIST, tendem, quando possível, a preferir a abordagem de certificação de seus MRCs utilizando um método primário, mas ainda assim, com confirmação por outros métodos (MAY e col., 2000).

Para realizar a certificação da concentração dos elementos de interesse no candidato a MR de mexilhão, optou-se por utilizar programa colaborativo, no qual se

³ Um método de medição primário é um método que tem as propriedades metrológicas mais elevadas, cuja operação pode ser completamente descrita e compreendida e para o qual uma declaração completa de incerteza pode ser escrita em termos de unidades do SI. Atualmente, a diluição isotópica com espectrometria de massa; a coulometria; a gravimetria; a titrimetria e a determinação do abaixamento do ponto de congelamento são consideradas métodos primários.

obtem o valor certificado por aplicação de técnicas estatísticas aos resultados obtidos por diversos laboratórios, utilizando-se, de preferência, diversas técnicas analíticas (ISO, 2006). A organização do programa foi realizada seguindo-se recomendações internacionais para o desenvolvimento e controle de programas colaborativos (ABNT, 1999a; 1999b). A partir da avaliação dos resultados do programa é possível emitir, ou não, o valor certificado para os analitos estudados no programa. Deve haver uma incerteza associada a cada valor certificado que inclua as incertezas devidas à caracterização do MR nos diversos laboratórios, bem como as incertezas devidas aos estudos de homogeneidade e estabilidade.

Além da utilização das recomendações da ISO, utilizaram-se os critérios da União Internacional de Química Pura e Aplicada, IUPAC, na análise dos resultados fornecidos pelos laboratórios participantes do programa colaborativo. Assim, se fez o uso de critérios de estatística robusta na definição dos valores de consenso, para propor a certificação de alguns elementos para o MR de mexilhão objeto deste estudo (THOMPSON e col., 2006).

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Preparo do material de referência

3.1.1 Obtenção do lote de mexilhões

Em outubro de 2005 foram adquiridos 164 kg de mexilhões de um produtor da Cooperativa de Produtores de Mexilhão da Praia da Cocanha (lat. -23,58°, lon. -45,31°) no município de Caraguatatuba, estado de São Paulo (FIG 3.1.1 e FIG 3.1.2), onde os mexilhões são cultivados pelo sistema de cordas imersas. Os animais utilizados, de tamanho comercial, apresentaram comprimento médio de $6,7 \pm 0,5$ cm e largura média de $5,5 \pm 0,4$ cm (valores médios e desvios padrão determinados em 10 indivíduos tomados aleatoriamente).

FIGURA 3.1.1 Área do cultivo de mexilhões na Praia da Cocanha em Caraguatatuba

FIGURA 3.1.2 Aspecto de uma corda de mexilhões de cultivo

3.1.2 Pré-tratamento

Todo o material que teve contato direto com os mexilhões foi previamente descontaminado com lavagem em banho de ácido nítrico P. A., 20 % (v/v), e com água ultra pura⁴ (Milli-Q). Parte dos mexilhões foi processada durante campanha de amostragem na Base Costeira de Ensino e Pesquisa "Clarimundo de Jesus" do IO-USP em Ubatuba e o restante foi congelado e processado no IPEN - CNEN/SP.

Inicialmente, os mexilhões foram limpos em água deionizada para a retirada de algas e outros materiais orgânicos aderidos às conchas. Também foi feita a retirada de cracas e o bisso dos animais, quando presentes. Posteriormente, os mexilhões foram abertos e lavados em água deionizada para a retirada do excesso de água do mar e possivelmente material particulado e areia. Após o escoamento do excesso de água (FIG 3.1.3a), os tecidos moles foram retirados das conchas (FIG 3.1.3b) e homogeneizados em liquidificador adaptado com pás de titânio (Performa Magiclean Arno), conforme apresentado na FIG 3.1.4a, seguindo o mesmo padrão de volume de material, velocidade e tempo de homogeneização. Para os mexilhões processados no IPEN - CNEN/SP, inicialmente permitiu-se o descongelamento à temperatura ambiente antes de se iniciar o procedimento de limpeza.

⁴ Neste texto optou-se por designar de "água ultra pura" a água deionizada obtida em equipamento Milli-Q para diferenciar da água deionizada obtida pelo sistema central de purificação de água do CRPq.

a)

b)

FIGURA 3.1.3 Tratamento prévio dos mexilhões

a)

b)

FIGURA 3.1.4 Homogeneização do tecido mole dos mexilhões (a) e armazenamento em embalagens estéreis (b)

Os tecidos homogeneizados foram acondicionados em embalagens estéreis de polietileno (Whirl-Pak) e armazenados em freezer a -20°C para posterior processamento (FIG 3.1.4b). Nesta etapa foram obtidos 90 pacotes de aproximadamente 400 g cada, totalizando aproximadamente 36 kg de material homogeneizado úmido.

3.1.3 Liofilização

Os pacotes com material homogeneizado úmido foram descongelados à temperatura ambiente e o material foi transferido para potes de polietileno previamente

limpos, de forma a se obter camada de aproximadamente 1 cm. O material foi novamente congelado antes da liofilização.

Foi utilizado o liofilizador Thermo Savant Modulyo D da Thermo Electron Corporation (FIG 3.1.5a). Aproximadamente 16 h de tratamento foram suficientes para a liofilização completa de cada carga de material nas prateleiras do liofilizador. O equipamento indicava a temperatura de -53°C e pressão de $45\text{ }\mu\text{bar}$ ao término da liofilização. No final do procedimento, foram obtidos 5,4 kg de material liofilizado, sendo 85 % o teor de umidade do material.

a) sistema em tambor acrílico

b) sistema em frascos de vidro

FIGURA 3.1.5 Liofilização do candidato a material de referência

3.1.4 Ajuste do tamanho de partículas

O material liofilizado, na forma de placas, foi submetido à moagem a seco, sendo o tempo de moagem padronizado para 1 minuto na velocidade 1 do liquidificador, preenchido com volume de 250 mL de material, para que se evitasse aquecimento do equipamento. Posteriormente, o material foi peneirado de maneira sequencial em peneiras com aberturas de malha cada vez menor: $500\text{ }\mu\text{m}$ (32 mesh), $354\text{ }\mu\text{m}$ (42 mesh), $250\text{ }\mu\text{m}$ (60 mesh), $177\text{ }\mu\text{m}$ (80 mesh), $149\text{ }\mu\text{m}$ (100 mesh), $125\text{ }\mu\text{m}$ (115 mesh) e $105\text{ }\mu\text{m}$ (150 mesh) (FIG 3.1.6). A parte do material que não passasse por determinada peneira era submetida novamente ao processo de moagem e peneiramento, sendo o procedimento repetido três vezes. As peneiras foram confeccionadas em poliéster (Tenyl Tecidos Técnicos Ltda.) para evitar contaminação do material. No final do processo obteve-se

2,4 kg de material passante em peneira de 105 μm . As porções que não passaram por esta peneira foram desprezadas para o preparo do MR de mexilhão.

FIGURA 3.1.6 Ajuste do tamanho de partículas por peneiramentos sucessivos

3.1.5 Controle de umidade

Após o ajuste do tamanho de partículas, determinou-se teor de umidade residual de 12 % no candidato a MR. O material foi novamente liofilizado, desta vez utilizando-se tubos de vidro apropriados para a liofilização de materiais na forma de pó (FIG 3.1.5b). Após o segundo processo de liofilização, o teor de umidade residual de 4,4 % foi obtido e considerado satisfatório. O detalhamento da determinação da umidade residual está descrito no item Resultados e Discussão deste trabalho.

3.1.6 Homogeneização

O candidato a material de referência foi homogeneizado por 72 horas no Homogeneizador em Y Marconi MA 201/10MO/E (FIG 3.1.7), que possui cuba de 10 L, confeccionada em aço inoxidável revestido com politetrafluoroetileno e rotação constante da cuba a 30 rotações por minuto.

FIGURA 3.1.7 Homogeneizador em Y Marconi MA 201/10MO/E

3.1.7 Envase

Imediatamente após o término da homogeneização, o material foi retirado do homogeneizador e envasado diretamente em frascos de vidro âmbar previamente descontaminados (FIG 3.1.8). Para a descontaminação dos frascos, estes foram imersos em solução de HNO_3 P. A. 10 % (v/v) por 24 horas, enxaguados em água deionizada e água ultra pura (Milli-Q) e imersos em água ultra pura por 24 horas. A secagem dos frascos foi realizada a temperatura ambiente em capela de fluxo laminar (Trox Technik). Foram obtidos 171 frascos de candidato a MR com massa média de 12,7 g cada.

FIGURA 3.1.8 Envase do candidato a material de referência de mexilhão

3.1.8 Estudo de atividade microbiológica

Porções do material foram irradiadas com radiação gama nas doses de 1, 2, 3, 4, 5, 15, 25, 30 e 50 kGy, utilizando-se a fonte de ^{60}Co do Irradiador Multipropósito do Centro de Tecnologia das Radiações, CTR, do IPEN - CNEN/SP. Toda manipulação posterior do material foi realizada em capela de fluxo laminar para evitar contaminação por bactérias do meio ambiente. Cerca de 3 g do material irradiado nas diversas doses e de material não irradiado (utilizado como controle) foram reidratados em 20 mL de soro fisiológico (cloreto de sódio 0,9 % (m/v), Baxter) em embalagens estéreis (Whirl-Pak) e, posteriormente, foi preparada suspensão com 100 mL de soro. Filtrou-se a vácuo diversos volumes da suspensão, utilizando-se membrana quadriculada de nitrato de celulose com tamanho de poro de 0,45 μm (Sartorius A. G.), conforme apresentado na FIG 3.1.9. As membranas foram acondicionadas sobre meio para cultura de microorganismos (Agar Tripcase Soja, Biomérieux Brasil S. A.) em placas de Petri e estas foram encubadas em estufa (Eletrolab) a 20 °C. Foram realizadas observações das placas em estereoscópio binocular (Askania GSZ) após 24 h, 48 h e uma semana de incubação, sendo as contagens de unidades formadoras de colônia, ufc, realizadas nesse último período.

a) suspensão das amostras

b) retirada de membrana após filtração

FIGURA 3.1.9 Preparo das placas de cultivo

3.1.9 Esterilização com radiação gama

A irradiação do lote de MR de mexilhão foi realizada com dose de radiação gama de 5 kGy. A definição da dose de irradiação está descrita em item posterior deste estudo. Os frascos do material foram empilhados em quatro camadas como mostrado na FIG 3.1.10, a 10 cm da fonte. A irradiação durou 1 h 20 min para que a dose desejada fosse

obtida. Foram colocados dosímetros tanto nas faces dos frascos diretamente expostos à fonte quanto nas faces opostas a esta, para se verificar a ocorrência de possíveis gradientes de fluxo, que poderiam de alguma forma influir na homogeneidade do material. Além disso, as amostras foram giradas 180° na metade da irradiação de forma a minimizar esse efeito.

FIGURA 3.1.10 Arranjo experimental para a irradiação com raios gama do candidato a material de referência

3.1.10 Armazenamento

Durante todo o procedimento de preparo do MR de mexilhão e após o envase em frascos de vidro, o lote foi armazenado em freezer vertical (Continental FC26) a -20 °C.

3.2 Determinação de umidade residual

O teor de umidade residual do candidato a MR de mexilhão foi determinado utilizando-se a balança termogravimétrica Shimadzu TGA-50, do CTR.

Utilizou-se cerca de 15 mg de amostra, pesada em cadinho de platina e submetida a programa de aquecimento sob atmosfera de ar com fluxo de 50 mL/min. Inicialmente, foi feita a caracterização do perfil de perda de massa da amostra, utilizando-se taxas de aquecimento de 2, 5 e 10 °C/min para obtenção de curvas termogravimétrica e termogravimétrica derivada, TG/DTG. Posteriormente, estimou-se a

umidade residual do candidato a MR de mexilhão em triplicata, nos frascos nº 10, 73 e 153, utilizando-se programas isotérmicos a 60, 85 e 100 °C.

Para a determinação do teor de umidade residual por secagem em estufa, pesou-se aproximadamente 500 mg do candidato a MR de mexilhão em pesa-filtro, previamente secos até massa constante, em balança analítica (Ohaus Adventurer). Posteriormente, o pesa-filtro foi colocado em estufa (Orion 5125) a 85° C por 24 horas. Após secagem, este foi armazenado em dessecador com sílica gel por 1 hora para resfriamento. Finalmente pesou-se novamente a amostra para o cálculo de perda de massa. O ensaio foi realizado em triplicata para os frascos nº 10, 73 e 153.

A umidade também foi determinada, juntamente com a composição centesimal, em laboratório comercial, seguindo-se método padronizado (CETAL, 2008; IAL, 2005). O mesmo laboratório forneceu resultado para a atividade de água do candidato a MR de mexilhão.

A determinação do teor de água pelo método de Karl Fischer foi realizada em laboratório comercial, utilizando-se o Método Geral 921 da Farmacopeia Americana (USP, 2009).

3.3 Caracterização granulométrica

Inicialmente, para se obter avaliação aproximada da distribuição granulométrica do candidato a MR, uma porção de 15 g do material ainda não envasado foi submetida a peneiramentos sucessivos com tamanhos de malha menores do que as utilizadas no preparo: 74 µm (200 mesh), 63 µm (250 mesh) e 53 µm (270 mesh).

Posteriormente, a distribuição granulométrica do candidato a MR de mexilhão foi determinada pela técnica de granulometria por difração de laser, utilizando-se o analisador de tamanho de partículas CILAS 1064L do Centro de Ciências e Tecnologia de Materiais, CCTM, do IPEN - CNEN/SP.

Sub-amostras dos frascos nº 52, 100 e 162 do candidato a MR, bem como de três frações com granulometria mais grossa, descartadas durante o processo de preparo do material, e alíquotas dos materiais de referência certificados NIST SRM 2976, NIST SRM 1566b, DORM-2, IAEA 407 foram dispersas em isopropanol P. A.

(Casa Americana) até se obter leitura de obscuração de aproximadamente 12 % no equipamento, para a determinação do perfil das curvas de distribuição granulométrica.

3.4 Determinação de elementos por Análise por Ativação Neutrônica Instrumental

Neste trabalho foi utilizado o método comparativo de Análise por Ativação Neutrônica Instrumental, INAA, para a determinação da concentração de Ag, As, Br, Co, Cr, Cs, Eu, Fe, La, Na, Rb, Sc, Se, Th e Zn no candidato a material de referência de mexilhão. Para isso, sub-amostras do material foram irradiadas juntamente com padrões dos elementos de interesse.

O método comparativo de INAA consiste em submeter amostras e padrões elementares simultaneamente a fluxo de nêutrons térmicos, produzidos em reator nuclear e, após período de decaimento apropriado, realizar a determinação da concentração dos elementos por meio da comparação da área dos picos das amostras com a área dos picos dos padrões de concentração conhecida, obtidos por espectrometria gama (EHMANN e VANCE, 1991).

3.4.1 Preparo de amostras e padrões para irradiação

Sub-amostras de aproximadamente 150 mg foram pesadas em balança analítica (Shimadzu AEM-5200), em invólucros de polietileno lavados com HNO_3 diluído e água ultra pura (Milli-Q). Também se utilizou as massas de 50, 150, 350 e 500 mg para alguns dos ensaios realizados.

Os padrões elementares foram preparados pipetando-se alíquotas de soluções padrão certificadas em tiras de papel de filtro Whatman nº 40, utilizando-se pipetadores automáticos, com volume nominal previamente verificado. Em alguns casos, as soluções foram diluídas antes de serem pipetadas. Após secagem à temperatura ambiente e em capela de fluxo laminar, as tiras de papel de filtro foram dobradas e colocadas em invólucros de polietileno, de modo a se obter a mesma geometria dos invólucros das amostras. Os volumes dos pipetadores e balões volumétricos utilizados foram calibrados gravimetricamente antes do preparo dos padrões (MOREIRA e col., 2006).

Na TAB 3.1 são apresentados os detalhes sobre os padrões elementares preparados. Foram preparados padrões multielementares quando as características dos

elementos assim o permitiram, tais como compatibilidade química das soluções, massa do elemento utilizada e características nucleares dos radionuclídeos de interesse.

TABELA 3.1 Preparo dos padrões pipetados para a INAA do candidato a MR de mexilhão^a

Padrão	Elemento	Procedência	Concentração na solução original, $\mu\text{g mL}^{-1}$	Solução diluída, $\mu\text{g mL}^{-1}$	Volume pipetado, μL	Massa no padrão, μg
AL	As	Spex	$1003,5 \pm 3,0$	$102,60 \pm 0,81$	$25,19 \pm 0,30$	$2,5847 \pm 0,080$
	La	Spex	$1000 \pm 3,0$	$9,891 \pm 0,071$	$25,19 \pm 0,30$	$0,2492 \pm 0,0041$
Ag	Ag	Aldrich	1010 ± 6	-	$25,19 \pm 0,30$	$25,44 \pm 0,56$
Br	Br	Spex	997 ± 3	$49,47 \pm 0,41$	$25,19 \pm 0,30$	$1,246 \pm 0,022$
CS	Co	Spex	$1001 \pm 3,0$	$102,35 \pm 0,81$	$25,19 \pm 0,30$	$2,578 \pm 0,080$
	Cr	Spex	$995,5 \pm 3,0$	$201,3 \pm 1,4$	$25,19 \pm 0,30$	$5,072 \pm 0,098$
	Cs	Spex	1000 ± 3	$4,894 \pm 0,016$	$25,19 \pm 0,30$	$0,1233 \pm 0,0019$
	Se	Spex	10009 ± 30	$99,00 \pm 0,71$	$25,19 \pm 0,30$	$2,494 \pm 0,041$
Eu	Eu	Spex	$1001,5 \pm 3$	$9,906 \pm 0,071$	$25,19 \pm 0,30$	$0,2495 \pm 0,0041$
FZ	Fe	Spex	10032 ± 30	-	$48,76 \pm 0,34$	$489,1 \pm 4,8$
	Zn	Spex	9994 ± 30	$1021,8 \pm 8,0$	$25,19 \pm 0,30$	$25,74 \pm 0,79$
Na	Na	Spex	9982 ± 30	-	$48,76 \pm 0,34$	$486,7 \pm 4,7$
RTS	Rb	Spex	999 ± 3	$402,2 \pm 2,8$	$25,19 \pm 0,30$	$10,13 \pm 0,15$
	Sc	Spex	1000 ± 3	$9,891 \pm 0,071$	$25,19 \pm 0,30$	$0,2492 \pm 0,0041$
	Th	Spex	1000 ± 3	$202,2 \pm 1,4$	$25,19 \pm 0,30$	$5,095 \pm 0,099$

^aincertezas apresentadas são incertezas expandidas, calculadas usando-se fator de abrangência $k = 2$, que fornece nível de confiança de aproximadamente 95 %

3.4.2 Irradiação e medição das radiações induzidas

Sub-amostras do material foram irradiadas juntamente com padrões dos elementos de interesse pelo período de 8 horas, sob fluxo de nêutrons térmicos de cerca de $10^{12} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ no reator IEA-R1 do IPEN - CNEN/SP.

Foram analisados, conjuntamente com as amostras, os MRCs apresentados na TAB 3.2 para validação do método utilizado.

TABELA 3.2 MRCs utilizados para o estudo por INAA

MRC	Nome original do MRC em inglês	Código
Tecido de mexilhão	Mussel tissue (trace elements and methylmercury)	NIST SRM 2976
Tecido de ostra	Oyster tissue	NIST SRM 1566b
Músculo de cação	Dogfish muscle certified reference material for trace metals	NRCC DORM-2
Fígado de cação	Dogfish liver certified reference material for trace metals	NRCC DOLT-3
Tecido de peixe	Trace elements and methylmercury in fish tissue	IAEA-407

Na TAB 3.3 são apresentados os radionuclídeos utilizados neste trabalho, bem como as características nucleares de interesse para INAA (IAEA, 1990).

As atividades gama induzidas dos radionuclídeos ^{76}As , ^{82}Br , ^{140}La e ^{24}Na foram medidas por 1,5 h, após período de decaimento de sete dias, enquanto que as atividades de $^{110\text{m}}\text{Ag}$, ^{60}Co , ^{51}Cr , ^{134}Cs , ^{59}Fe , ^{152}Eu , ^{86}Rb , ^{75}Se , ^{46}Sc , ^{233}Pa (para Th) e ^{65}Zn foram medidas por 10 h, após período de decaimento de 20 a 25 dias.

A medição das radiações gama foi realizada utilizando-se detector de germânio hiperpuro Canberra GC2018 HP Ge, acoplado a um analisador multicanal Canberra DSA-1000. Os espectros de raios gama foram coletados e processados utilizando-se o programa Genie 2000, versão 3.1 (Canberra). O cálculo da concentração dos elementos foi realizado utilizando-se planilha eletrônica (Microsoft Excel).

TABELA 3.3 Radionuclídeos utilizados para determinação elementar por INAA (IAEA, 1990)

Elemento	Radionuclídeo	Energia, keV	Meia vida
Ag	^{110m}Ag	657,76*	249,76 d
		677,62	
		706,68	
		763,94	
		884,69	
		937,49	
		1384,30	
		1505,04	
As	^{76}As	559,10	26,32 h
Br	^{82}Br	554,35	35,3 h
		619,11	
		698,37	
		776,52*	
		827,83	
		1044,08	
		1317,47	
Co	^{60}Co	1173,24*	5,27 a
		1332,50	
Cr	^{51}Cr	320,08	27,7 d
Cs	^{134}Cs	604,70	2,06 a
		795,85*	
Eu	^{152}Eu	121,78	13,33 a
		344,29	
		778,92	
		964,11	
		1085,89	
		1408,00*	
Fe	^{59}Fe	1099,25*	44,5 d
		1291,60	
La	^{140}La	328,76	40,27 h
		487,02	
		815,77	
		1596,21*	
Na	^{24}Na	1368,60	14,96 h
Rb	^{86}Rb	1076,6	18,66
Sc	^{46}Sc	889,28*	83,81 d
		1120,55	
Se	^{75}Se	136,01	119,77 d
		264,66*	
		279,54	
Th	^{233}Pa	300,18	27,0 d
		312,01*	
Zn	^{65}Zn	1115,6	243,9 d

* Energia do fotopico recomendado

3.5 Determinação de elementos por Análise por Ativação Neutrônica Instrumental com padronização k_0

Neste estudo, foi utilizado o método de Análise por Ativação Neutrônica Instrumental com padronização k_0 , k_0 -INAA, para a determinação da concentração de Al, Br, Cl, K, Mg, Mn, Na e V no candidato a material de referência de mexilhão e no estudo de homogeneidade entre frascos desses elementos. Para tanto, sub-amostras do material foram irradiadas no Sistema Pneumático Rápido, SIPRA, do Reator Português de Investigação, RPI, do Instituto Tecnológico e Nuclear Português, ITN (FREITAS e col., 2003; DUNG e col., 2008).

Para o método k_0 -INAA, não há necessidade de se irradiar padrões dos elementos a serem determinados. No entanto, utilizam-se monitores para a medição exata do fluxo de nêutrons do reator em seus componentes térmico e epitérmico. Além disso, as eficiências do detector para as energias de interesse devem ser muito bem caracterizadas (PARRY, 2003).

3.5.1 Preparo de amostras

Sub-amostras de aproximadamente 50 mg foram pesadas em balança analítica (Sartorius Research), em cápsulas de polietileno lavadas com HNO_3 diluído e água deionizada. Também foram pesadas sub-amostras dos MRs de fígado de boi, NBS SRM 1577a (*bovine liver*) e homogeneizado de peixe, IAEA MA-A (*fish homogenate*) para validação do método utilizado.

3.5.2 Irradiação e medição das radiações induzidas

Sub-amostras do candidato a MR de mexilhão e dos MR citados no item anterior foram irradiadas, juntamente com liga de alumínio e ouro em folha (0,1 % de ouro), utilizada como comparador para o k_0 -INAA, por período de 180 s, sob fluxo de nêutrons térmicos de $10^{13} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ no RPI/ITN.

Na TAB 3.4 são apresentados os radionuclídeos de meia vida curta utilizados nesse trabalho, bem como as características nucleares de interesse para k_0 -INAA (IAEA, 1990).

TABELA 3.4 Radionuclídeos utilizados para determinação elementar por k_0 -INAA (IAEA, 1990)

Elemento	Radionuclídeo	Energia, keV	Meia vida
Al	^{28}Al	1778,99	2,24 min
Br	^{80}Br	616,0	17,68 min
Cl	^{38}Cl	1642,69*	37,24 min
		2167,68	
K	^{42}K	1524,58	12,36 h
Mg	^{27}Mg	1014,43	9,46 min
Mn	^{56}Mn	846,8	2,58 h
		1810,72*	
Na	^{24}Na	1368,60*	14,96 h
		2754,00	
V	^{52}V	1434,08	3,75 min

* Energia do fotopico recomendado

Para os materiais biológicos, as atividades gama induzidas dos radionuclídeos foram medidas por 10 min, após período de decaimento de 120 s, enquanto que para o comparador, o tempo de medição foi de 1 h após tempo de decaimento aproximado de 4 h.

A medição das radiações gama induzidas foi realizada utilizando-se detector de germânio hiperpuro Canberra GC2018 HP Ge acoplado a um analisador multicanal Ortec Dspec Jr. 2.0. A aquisição e análise espectral foi realizada pelo programa Gamma Vision e o cálculo das concentrações dos elementos foi realizada com o programa k_0 -INAA (ROSSBACH e col., 2007).

3.6 Determinação de elementos por Espectrometria de Absorção Atômica

A Espectrometria de Absorção Atômica, AAS, consiste em determinar os elementos de interesse por meio da absorção de radiação por átomos livres no estado gasoso (WELZ e SPERLING, 1999). As diversas modalidades da técnica se relacionam à maneira pela qual a atomização é obtida. Quando a atomização é realizada em forno de grafite pirolítico, tem-se a Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica, ET AAS. Devido à sua pressão de vapor elevada, mercúrio pode ser determinado pela técnica de Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Vapor

Frio, CV AAS. Nesse caso, os íons mercúricos presentes na solução da amostra são reduzidos a mercúrio metálico por agente redutor, usualmente cloreto estânico e, posteriormente, são levados por um gás de arraste ao tubo de absorção, onde são medidos.

Mercúrio foi determinado no LAN por CV AAS, utilizando-se o espectrômetro Perkin Elmer FIMS (*Flow Injection Mercury System*) que faz a determinação por injeção em fluxo, enquanto que cádmio e chumbo foram determinados por ET AAS utilizando-se o espectrômetro Perkin Elmer AAnalyst 800. Foram utilizados os métodos instrumentais recomendados pelo fabricante dos equipamentos.

3.6.1 Digestão ácida

Utilizou-se massa de aproximadamente 350 mg, pesada em balança analítica (Ohaus AR2140 Adventurer) para a maior parte das análises. Nos casos em que outras massas foram utilizadas, isso está explicitado no texto.

Sub-amostras do candidato a MR de mexilhão e de MRCs foram submetidas à digestão ácida, seguindo-se protocolo desenvolvido pelos Laboratórios de Estudos Ambientais Marinhos da IAEA, MESL (MESL, 1998). Sub-amostras foram pesadas em frascos de perfluoroalcoxi, PFA, de $(25,3 \pm 0,07)$ mL (Savillex) e adicionaram-se 4 mL de HNO_3 P. A. concentrado (Merck). Os frascos foram fechados e deixados em repouso por cerca de 8 h. Após este período, adicionou-se 1 mL de peróxido de hidrogênio 20 % (v/v) e os frascos foram novamente deixados em repouso, por período de aproximadamente 15 h.

Para finalizar a digestão, os frascos foram colocados em bloco digestor (Tecnal) a 90°C por 3 h. Após o término da digestão, deixou-se que os frascos atingissem a temperatura ambiente, completou-se o volume com água ultra pura (Milli-Q), seguido de homogeneização dos frascos por agitação.

Para cada lote de sub-amostras, foi preparado o branco dos reagentes, que consiste de frasco com os reagentes utilizados para a digestão. O branco dos reagentes também passou pelo mesmo procedimento de digestão a que foram submetidas as sub-amostras e foi medido durante a determinação de Hg, Cd e Pb.

3.6.2. Preparo de soluções

3.6.2.1 Soluções padrão de mercúrio

Na TAB 3.5 são apresentadas as diluições realizadas na solução estoque 1 de mercúrio cuja concentração é $1,174 \pm 0,0002 \text{ mg mL}^{-1}$, para o preparo das soluções utilizadas na construção da curva analítica, de concentrações entre 0,5 e 4 ng mL^{-1} . Essa solução foi preparada pela dissolução de $0,11712 \pm 0,00002 \text{ g}$ de mercúrio metálico P. A. (Merck), pesado em balança analítica (Shimadzu AEM-5200), em HNO_3 P. A. concentrado (Merck) com posterior ajuste de volume para a concentração de 10 % (v/v) para o HNO_3 em balão volumétrico de 100 mL ($99,846 \pm 0,029 \text{ mL}$). Para garantir a estabilidade, foram adicionados 2 mL de solução de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 10 % (m/v) no preparo da solução estoque 2. A solução estoque 3 foi preparada a cada dia de análise.

TABELA 3.5 Diluições para o preparo das soluções padrão de mercúrio^a

Solução	Concentração inicial, ng mL^{-1}	Volume pipetado, μL	Volume final, mL	Concentração final, ng mL^{-1}
Estoque 1	-	-	-	$1,17 \times 10^6$
Estoque 2	$1,17 \times 10^6$	$98,54 \pm 0,3$	$99,8 \pm 0,1$	$1157,93 \pm 0,01$
Estoque 3	$1157,93 \pm 0,01$	$1018,5 \pm 0,4$	$9,9 \pm 0,1$	$118,1 \pm 0,2$
Hg1	$118,1 \pm 0,2$	100	$25,30 \pm 0,07$	0,47
Hg2	$118,1 \pm 0,2$	300	$25,30 \pm 0,07$	1,40
Hg3	$118,1 \pm 0,2$	500	$25,30 \pm 0,07$	2,33
Hg4	$118,1 \pm 0,2$	700	$25,30 \pm 0,07$	3,27
Hg5	$118,1 \pm 0,2$	850	$25,30 \pm 0,07$	3,97

^aincertezas apresentadas são incertezas expandidas, calculadas usando-se fator de abrangência $k = 2$, que fornece nível de confiança de aproximadamente 95 %

3.6.2.2 Soluções padrão de cádmio

A solução estoque 1 de cádmio, de concentração $(1000 \pm 3,0) \mu\text{g mL}^{-1}$ (Perkin Elmer Pure) foi diluída conforme descrito na TAB 3.6 para se obter as soluções estoque 2 e estoque 3. Essa última por sua vez foi diluída pelo autoamostrador AS-800 do espectrômetro para se obter as concentrações entre 1,3 e 5,3 ng mL^{-1} , utilizadas para a

construção da curva analítica. A solução estoque 3 foi preparada a cada dia de análise e consistiu na concentração mais elevada da curva analítica.

3.6.2.3 Soluções padrão de chumbo

A solução estoque 1 de chumbo, de concentração $(1003 \pm 3,0) \mu\text{g mL}^{-1}$ (Perkin Elmer Pure) foi diluída conforme descrito na TAB 3.7 para se obter as soluções estoque 2 e estoque 3. Essa última por sua vez foi diluída pelo autoamostrador AS-800 do espectrômetro para se obter as concentrações entre 3,7 e 11,9 ng mL^{-1} , utilizadas para a construção da curva analítica. A solução estoque 3 foi preparada a cada dia de análise e consistiu na concentração mais elevada da curva analítica.

TABELA 3.6 Diluições para o preparo das soluções padrão de cádmio^a

Solução	Concentração inicial, ng mL^{-1}	Volume pipetado, μL	Volume final	Concentração final, ng mL^{-1}
Estoque 1	-	-	-	$1,000 \times 10^6$
Estoque 2	$1,000 \times 10^6$	$200,85 \pm 0,4$	$99,8 \pm 0,1 \text{ mL}$	2012 ± 12
Estoque 3	2012 ± 12	$33,43 \pm 0,08$	$10,08 \pm 0,1 \text{ mL}$	$6,68 \pm 0,04$
Cd1	$6,68 \pm 0,04$	4	20 μL	1,3352
Cd2	$6,68 \pm 0,04$	8	20 μL	2,6704
Cd3	$6,68 \pm 0,04$	12	20 μL	4,0056
Cd4	$6,68 \pm 0,04$	16	20 μL	5,3408
Cd5	$6,68 \pm 0,04$	20	20 μL	6,676

^aincertezas apresentadas são incertezas expandidas, calculadas usando-se fator de abrangência $k = 2$, que fornece nível de confiança de aproximadamente 95 %

TABELA 3.7 Diluições para o preparo das soluções padrão de chumbo^a

Solução	Concentração inicial, ng mL ⁻¹	Volume pipetado, µL	Volume final	Concentração final, ng mL ⁻¹
Estoque 1	-	-	-	1,003 x 10 ⁶
Estoque 2	1,003 x 10 ⁶	98,54 ± 0,4	99,8 ± 0,1 mL	990 ± 4
Estoque 3	990 ± 4	150 ± 0,4	10,0 ± 0,1 mL	14,8 ± 0,3
Pb1	14,8 ± 0,3	4	20 µL	2,968
Pb2	14,8 ± 0,3	8	20 µL	5,936
Pb3	14,8 ± 0,3	12	20 µL	8,904
Pb4	14,8 ± 0,3	16	20 µL	11,872
Pb5	14,8 ± 0,3	20	20 µL	14,84

^aincertezas apresentadas são incertezas expandidas, calculadas usando-se fator de abrangência $k = 2$, que fornece nível de confiança de aproximadamente 95 %

3.6.2.4 Soluções complementares

Solução de HNO₃ P. A. 0,2 % (v/v) (Merck) foi utilizada como diluente para a construção das curvas de calibração de Cd e Pb. Essa solução também foi utilizada como branco da calibração no preparo das curvas analíticas. Para a construção das curvas analíticas e determinação dos elementos nas amostras, foi utilizada, tanto para Cd quanto para Pb, solução de modificador químico de NH₄H₂PO₄ 0,5 % (m/v) e Mg(NO₃)₂ 0,03 % (m/v) (Perkin Elmer), de acordo com recomendação do fabricante do espectrômetro.

Como o espectrômetro FIMS opera em sistema de injeção em fluxo, as soluções a serem medidas são injetadas em fluxo carregador. O carregador consiste de solução de HCl P. A. 3% (v/v) (Merck). Para a redução do Hg²⁺ presente nas soluções a Hg⁰, utilizou-se como redutor, solução de SnCl₂ . 2H₂O P. A. 3 % (m/v) (Merck) em HCl P. A. 3 % (v/v) (Merck).

3.6.3 Parâmetros de análise

3.6.3.1 Determinação de mercúrio

Na TAB 3.8 são descritos os parâmetros utilizados para a determinação de Hg com o espectrômetro FIMS. As soluções padrão utilizadas no preparo da curva analítica também passaram pelo processo de digestão a 90°C por 3 h antes da medição. O ajuste da curva analítica e os cálculos de concentração foram efetuados pelo programa Winlab 32 for AAS, versão 6.2.0.0079 (Perkin Elmer), levando em consideração o sinal analítico obtido para o branco da calibração, que no caso do Hg, foi a mesma solução utilizada como branco do reagente. Utilizou-se para o ajuste da curva, o modo de regressão linear, com o coeficiente linear calculado a partir dos dados experimentais e não fixado em zero para a concentração zero de mercúrio. O sinal analítico foi determinado a partir da altura do pico de absorção.

TABELA 3.8 Parâmetros utilizados para a determinação de mercúrio por CV AAS

Volume de injeção	500 μL
Fluxo do carregador	10 mL min^{-1}
Fluxo do redutor	6 mL min^{-1}
Fluxo de argônio (gás de arraste)	50 mL min^{-1}

3.6.3.2 Determinação de cádmio

Na TAB 3.9 são descritos os parâmetros utilizados para a determinação de Cd com o espectrômetro AAnalyst800, enquanto que na TAB 3.9 são apresentadas as condições utilizadas para a atomização do elemento. O ajuste da curva analítica e os cálculos de concentração foram efetuados pelo programa Winlab 32 for AAS, versão 6.2.0.0079 (Perkin Elmer), levando em consideração o sinal analítico obtido para o branco da calibração. Utilizou-se para o ajuste da curva, o modo de regressão linear, com o coeficiente linear calculado a partir dos dados experimentais e não fixado em zero para a concentração zero de cádmio. O sinal analítico foi determinado a partir da área do pico de absorção.

TABELA 3.9 Parâmetros utilizados para a determinação de cádmio por ET AAS

Lâmpada de Cd	EDL
Comprimento de onda utilizado	228,8 nm
Fenda	0,7 nm
Corrente da lâmpada	230 mA
Volume de injeção da amostra	20 µL
Volume de injeção do modificador químico	10 µL

Tabela 3.10 Parâmetros do programa de aquecimento do forno de grafite para a determinação de cádmio por ET AAS

Etapa	Temperatura, °C	Rampa de aquecimento, °C s ⁻¹	Patamar, s	Fluxo interno de argônio, mL min ⁻¹	Leitura
Secagem 1	110	1	30	250	Não
Secagem 2	130	15	30	250	Não
Pirólise	500	10	20	250	Não
Atomização	1500	0	5	0	Sim
Limpeza	2450	1	3	250	Não

3.6.3.3 Determinação de chumbo

Na TAB 3.11 são descritos os parâmetros utilizados para a determinação de Pb com o espectrômetro AAnalyst 800, enquanto que na TAB 3.12 são apresentadas as condições utilizadas para a atomização do elemento. O ajuste da curva analítica e os cálculos de concentração foram efetuados pelo programa Winlab 32 for AAS, versão 6.2.0.0079 (Perkin Elmer), levando em consideração o sinal analítico obtido para o branco da calibração. Utilizou-se para o ajuste da curva, o modo de regressão linear, com o coeficiente linear calculado a partir dos dados experimentais e não fixado em zero para a concentração zero de chumbo. O sinal analítico foi determinado a partir da área do pico de absorção.

TABELA 3.11 Parâmetros utilizados para a determinação de chumbo por ET AAS

Lâmpada de Pb	EDL
Comprimento de onda utilizado	283,3 nm
Fenda	0,7 nm
Corrente da lâmpada	440 mA
Volume de injeção da amostra	20 µL
Volume de injeção do modificador químico	10 µL

Tabela 3.12 Parâmetros do programa de aquecimento do forno de grafite para a determinação de chumbo por ET AAS

Etapa	Temperatura, °C	Rampa de aquecimento, °C s ⁻¹	Patamar, s	Fluxo interno de argônio, mL min ⁻¹	Leitura
Secagem 1	110	1	30	250	Não
Secagem 2	130	15	30	250	Não
Pirólise	850	10	20	250	Não
Atomização	1600	0	5	0	Sim
Limpeza	2450	1	3	250	Não

3.6.4. Descontaminação de material volumétrico

O material volumétrico utilizado para a determinação por AAS passou por processo de descontaminação.

O material foi colocado em banho de detergente neutro Extran 2 % (v/v) (Merck) por 24 h. Após esse período, o material passou por três banhos de HNO₃ P. A. (Carlo Erba) 20 % (v/v) por período de 24 h em cada banho. Finalmente, o material foi enxaguado com água deionizada e com água ultra pura (Milli-Q) e seco à temperatura ambiente em capela de fluxo laminar.

Para a descontaminação dos frascos de PFA, utilizados na digestão das amostras, esses foram colocados em banho de detergente neutro Extran 2 % (v/v) (Merck) por 24 h. Posteriormente, foram colocados em bloco digestor por período de 3 h a 60 °C com HNO₃ P. A. (Carlo Erba) 50 % (v/v). Por fim, os frascos foram enxaguados com água deionizada e com água ultra pura (Milli-Q) e secos à temperatura ambiente em capela de fluxo laminar.

3.7 Estudo de homogeneidade por INAA

Para o estudo de homogeneidade entre frascos, seis frascos do candidato a MR de mexilhão (raiz cúbica do número total de frascos) foram escolhidos de forma aleatória estratificada (frascos nº 19, 40, 74, 112, 143 e 150). A amostragem foi realizada utilizando-se o programa HISTO, fornecido pela IAEA, para a geração aleatória dos números dos frascos a serem analisados (RADECKI e TRINKEL, 2002).

Oito sub-amostras de aproximadamente 150 mg de cada frasco foram analisadas por INAA, também de maneira aleatória, para a determinação da concentração de Ag, As, Br, Co, Cr, Cs, Eu, Fe, La, Na, Rb, Sc, Se, Th e Zn.

O frasco nº 90 foi escolhido para o estudo de homogeneidade dentro do frasco. Foram determinadas as concentrações dos elementos Ag, As, Br, Co, Cr, Cs, Eu, Fe, La, Na, Rb, Sc, Se, Th e Zn por INAA, de forma aleatória, utilizando-se massas de 50, 150, 250, 350 e 500 mg.

3.8 Estudo de homogeneidade por k_0 -INAA

Para o estudo de homogeneidade entre frascos, três frascos do candidato a MR de mexilhão foram escolhidos de forma aleatória estratificada (frascos nº 11, 33 e 161). A amostragem foi realizada utilizando-se o programa HISTO fornecido pela IAEA para a geração aleatória dos números dos frascos a serem analisados (RADECKI e TRINKEL, 2002).

Seis sub-amostras de aproximadamente 50 mg de cada frasco foram analisadas por k_0 -INAA, também de maneira aleatória, para a determinação da concentração de Al, Br, Cl, K, Mg, Mn, Na e V.

3.9 Estudo de homogeneidade por AAS

Para o estudo da homogeneidade entre frascos por AAS, para os elementos Hg, Cd e Pb, foram utilizadas os mesmos frascos, números de sub-amostras e ordem de medição dos descritos no item 3.7. Porém a massa aproximada de sub-amostra utilizada foi 350 mg. Para o estudo de homogeneidade dentro do frasco, utilizou-se o frasco nº 12 e massas de amostra de 50, 150, 200, 350 e 500 mg.

3.10 Estudos de estabilidade por INAA

Para o estudo de estabilidade a curto prazo, doze frascos do candidato a MR de mexilhão foram escolhidos aleatoriamente e armazenados em diversas temperaturas (20 °C, 40 °C e 60 °C) por períodos de tempo de 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 meses (frascos nº 7, 13, 15, 51, 65, 81, 86, 111, 125, 150, 166 e 170).

Após o tempo de exposição às diversas temperaturas, as concentrações de Ag, As, Br, Co, Cr, Cs, Eu, Fe, La, Na, Rb, Se, Sc, Th e Zn foram determinadas por INAA em quatro sub-amostras do material para cada frasco, para posterior comparação com as concentrações obtidas para o frasco controle, armazenado a -20 °C (frasco nº 104).

Para o estudo de estabilidade a longo prazo, seis frascos do candidato a MR de mexilhão foram armazenados a temperatura ambiente (20 °C) por períodos de tempo de 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses (frascos nº 14, 42, 62, 99, 128 e 147). Posteriormente, as concentrações dos elementos, determinadas por INAA, foram comparadas às obtidas para o frasco controle, armazenado a -20 °C (frasco nº 115). Desse modo, foram utilizados sete frascos do candidato a MR de mexilhão.

Nas FIGs 3.8.1 e 3.8.2 são apresentados os planejamentos para os estudos de estabilidade a curto e a longo prazo, respectivamente. Espaços sombreados representam o tempo de armazenamento em cada temperatura até o tempo 0, isto é, o final do tempo de exposição e análise de amostras.

Temperatura x Tempo	2,0 meses	1,5 meses	1,0 mês	0,5 mês	0 mês
-20 °C	X				
20 °C	X				
		X			
			X		
				X	
40 °C	X				
		X			
			X		
				X	
60 °C	X				
		X			
			X		
				X	

FIGURA 3.8.1 Planejamento isócrono para o estudo de estabilidade a curto prazo

Temperatura x Tempo	12 meses	10 meses	08 meses	06 meses	04 meses	02 meses	0 mês
-20 °C	X						
20 °C	X						
		X					
			X				
				X			
					X		
						X	

FIGURA 3.8.2 Planejamento isócrono para o estudo de estabilidade a longo prazo

3.11 Estudo de estabilidade por AAS

Todas as condições descritas no item 3.10 foram utilizadas para o estudo de estabilidade de Hg, Cd, e Pb por AAS, com exceção da massa de sub-amostras utilizadas, que foi de aproximadamente 350 mg.

3.12 Programa colaborativo para certificação

Dez laboratórios nacionais e nove laboratórios internacionais, com competência analítica comprovada na determinação de elementos em amostras ambientais, aceitaram participar do projeto. Apresenta-se no Apêndice 1 a carta convite enviada aos laboratórios participantes. Foi sugerido que aos laboratórios determinassem os elementos os quais sua capacidade analítica permitisse. Foi requisitado o envio dos resultados em massa seca para seis determinações de cada elemento, obtidas de maneira independente, em dois frascos do candidato a MR enviados. Também foi solicitado aos laboratórios o envio de resultados para três sub-amostras de material de controle de qualidade, um MRC, a escolha do laboratório. O laboratório deveria entregar a descrição sucinta do método utilizado. Uma descrição detalhada da avaliação das incertezas envolvidas na determinação dos analitos, apesar de bem vinda, não foi obrigatória. No Apêndice 2 é apresentado o modelo, preparado no Microsoft Excel, para que os laboratórios enviassem os resultados por meio de correio eletrônico.

Versões da carta convite e do formulário nas línguas espanhola e inglesa foram preparadas para envio aos participantes de países da América Latina e demais países.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudo de atividade microbiológica

Ao se observar as placas de Petri em estereoscópio binocular, verificou-se crescimento de colônias apenas para o material não irradiado e para as doses de 1 e 3 kGy. Surpreendentemente, não foi observada formação de colônias para a dose de 2 kGy, que se justifica devido à elevada incerteza neste tipo de estudo. Esses resultados confirmam a eficácia da irradiação com radiação gama para esterilizar amostras biológicas em geral e, em particular, candidatos a material de referência biológicos.

Nas FIG 4.1.1 e 4.1.2, apresentam-se o aspecto das placas incubadas sem irradiação e com dose de 30 kGy. Observou-se formação de colônias de dois microorganismos, uma de cor salmão e outra de cor amarelo intenso. Pela coloração, é possível que o segundo tipo de colônia seja formado por *Staphylococcus aureus* (Rosenbach, 1884). Porém, apenas com identificação por testes específicos seria possível afirmar com precisão quais os microorganismos em questão.

a) amostra não irradiada

b) amostra irradiada a 30 kGy

FIGURA 4.1.1 Aspecto das membranas controle (a) e irradiada (b) após uma semana de incubação

FIGURA 4.1.2 Desenvolvimento de diferentes tipos de colônia para a amostra não irradiada

A partir da contagem de colônias nas placas de Petri, a carga microbiológica do material não irradiado foi estimada como $3,3 \times 10^3$ ufc/g de amostra seca ou 495 ufc/g de amostra úmida, ao se considerar teor de umidade de 85 %. Esta carga microbiológica pode ser considerada baixa, por ser inferior a 10^3 ufc/g, nível de tolerância aceitável em moluscos bivalves in natura, resfriados ou congelados, destinados a consumo humano (ANVISA, 2001). Para a dose de 3 kGy foi observada a formação de 9 ufc/g do material na base seca.

A sensibilidade de microorganismos sujeitos a algum estresse, como radiação, pode ser estimada pelo valor de redução decimal, D_{10} . Este valor é a quantidade de radiação necessária para reduzir 90 % da população inicial de uma bactéria específica sob condições especificadas (MOLINS, 2001).

O valor D_{10} pode ser determinado a partir de gráfico, aplicando-se a Equação 4.1 à inclinação da reta obtida no gráfico de unidades formadoras de colônia (em logaritmos na base 10) versus dose absorvida, como a apresentada na FIG 4.1.3 para os dados deste trabalho. Assim, o D_{10} foi calculado como 0,97 kGy.

$$D_{10} = -1 \left(\frac{1}{a} \right) \quad (4.1)$$

onde:

a é a inclinação da reta do gráfico de população bacteriana versus dose de irradiação.

FIGURA 4.1.3 Contagem de unidades formadoras de colônia por massa de amostra após irradiação com diversas doses

A partir do gráfico da FIG 4.1.3, observa-se que a irradiação com dose de 4 kGy permite a descontaminação do candidato a material de referência, ao menos para os microorganismos que se desenvolveram nas condições de cultura utilizadas no ensaio. Devido à incerteza do método utilizado para a determinação da carga microbiológica, optou-se por adicionar 1 kGy à irradiação do lote, de maneira a se obter um nível de garantia de segurança, SAL, de 1 log.

A eficácia de processos antimicrobiais pode ser considerada em termos do número de reduções de log 10 (número de valores D_{10}) necessário para se atingir determinado nível de segurança. Nos Estados Unidos da América, um nível de redução de segurança comum é de cinco ciclos de log 10 (MOLINS, 2001), para que se obtenha esterilização considerada efetiva e segura do ponto de vista alimentar. Neste trabalho considerou-se que um SAL de cinco ciclos seria desnecessário uma vez que o material não se destina a consumo humano.

4.2 Esterilização com radiação gama

De acordo com o Certificado de Dosimetria, o gradiente de dose variou de 0 a 0,5 kGy dependendo da posição medida. Obteve-se a dose média de $5,1 \pm 0,3$ kGy, considerando-se os resultados para os oito dosímetros (Amber 3041 Batch R) utilizados durante a irradiação e medidos no Espectrofotômetro Genesys 20 (CTR, 2007).

4.3 Determinação de composição centesimal

A composição centesimal traz informações importantes sobre aspectos nutricionais de alimentos, tais como o valor energético e os teores de carboidratos, proteínas, gorduras totais e ácidos graxos. A inclusão dessas informações por produtores de MRCs pode ser útil para estudos da área de nutrição e são geralmente apresentados como valores de referência (NIST, 2001).

Na TAB 4.3.1 são apresentadas algumas informações nutricionais para o candidato a MR de mexilhão. Deve-se ressaltar que, uma vez que os dados estão apresentados em base seca, pode ser necessário que o usuário converta os seus dados para base úmida para fins de comparação. No caso particular de mexilhões, é sabido que a composição centesimal desses organismos depende do sexo, da época da coleta e da fase de maturação sexual dos indivíduos (MEDEIROS, 2001). Além disso, há grande interesse nestas informações uma vez que mexilhões são considerados fonte de proteína com baixo teor de lipídeos (entre 2,5 a 5 %, em massa úmida), teor médio de carboidratos (cerca de 3%, em base úmida) e presença de ácidos graxos ômega-3 (PARISENTI e col., 2008).

TABELA 4.3.1 Dados de informação nutricional, por 100 g de amostra liofilizada

Análise	Resultado	% VD ^a
Valor energético	384 kcal/1613 kJ	19
Carboidratos	14 g	5
Proteínas	66 g	88
Gorduras totais	7,0 g	13
Umidade	3,03 %	-
Cinzas	9,62 %	-

^a valores diários de referência com base em dieta de 2000 kcal ou 8400 kJ

4.4 Determinação de umidade residual

Durante o preparo do candidato a MR de mexilhão, o teor de umidade residual do material ainda não embalado foi determinado em amostra de massa aproximada de 0,5 g, em balança determinadora de umidade, Ohaus MB45, com programa de aquecimento linear até 100 °C e término do teste ao ocorrer variação de massa inferior a

1 mg por 90 s. Foi observado teor de umidade residual de 12 %, considerado alto no que se refere à estabilidade do material. Após novo processo de liofilização, neste caso do lote de amostra na forma de pó, foi obtido teor de umidade residual de 4,4 %, considerado satisfatório. Como materiais de referência biológicos liofilizados tendem a ser higroscópicos, é possível que o candidato a MR de mexilhão tenha absorvido umidade do ar durante o processo de moagem após a liofilização, ainda que a manipulação tenha sido efetuada em ambiente com umidade relativa do ar inferior a 50 %, com utilização de desumidificador.

Para se verificar a temperatura de secagem ideal para a definição da massa seca do material, utilizou-se a termogravimetria, TG. Para se obter valor de referência representativo para o lote, os dados de termogravimetria foram confirmados com a determinação de umidade por secagem em estufa.

Inicialmente foram obtidas as curvas TG/DTG dinâmicas com taxa de aquecimento de 10 °C/min, apresentadas na FIG 4.4.1, para verificação do comportamento térmico da amostra. Foi observado que a decomposição térmica é dividida em três etapas. A primeira ocorre da temperatura ambiente a aproximadamente 140 °C e está relacionada à perda da umidade residual presente na amostra. A segunda etapa ocorre entre 140 °C e 478 °C e finalmente a última etapa, onde a maior parte da matéria orgânica é eliminada, ocorre entre 478 °C e 697 °C. Após o término da análise, em 900 °C, foi possível observar resíduo de coloração branca, formado provavelmente por óxidos de elementos presentes na amostra.

Ao se utilizar outras taxas de aquecimento, observou-se deslocamento dos eventos térmicos para temperaturas mais elevadas ao se aumentar a taxa de aquecimento. Esse comportamento é usual em termogravimetria (WENDLANDT, 1986). Os resultados observados para o primeiro evento térmico são apresentados na FIG 4.4.2, obtidos para uma amostra teste.

Observou-se que as curvas termogravimétricas não apresentam patamares bem definidos e, portanto, a separação entre as etapas de decomposição não é muito clara. Este fenômeno é típico de materiais amorfos ou de origem biológica e dificulta a definição da temperatura na qual a massa seca de materiais biológicos deve ser determinada por métodos térmicos. Esta questão pode influir na determinação da incerteza do valor certificado de MRs em fase de preparação (ZEILLER e col., 2007).

FIGURA 4.4.1 Curvas TG/DTG obtidas em cadinho de platina, sob atmosfera dinâmica de ar a 50 mL/min e taxa de aquecimento de 10 °C/min para o candidato a MR de mexilhão

FIGURA 4.4.2 Curvas TG obtidas em cadinho de platina, sob atmosfera dinâmica de ar a 50 mL/min e a diversas taxas de aquecimento para o candidato a MR de mexilhão

Para as curvas TG obtidas isotermicamente, foi observado que a perda de massa a 60 °C não é completa, enquanto que as perdas de massa a 85 °C e a 100 °C são equivalentes (FIG 4.4.3). Assim, optou-se por utilizar a temperatura de 85 °C para se determinar a perda de massa do candidato a MR de mexilhão, temperatura na qual possíveis perdas de compostos voláteis são minimizadas, se comparada à 100 °C.

FIGURA 4.4.3 Curvas TG isotérmicas (60, 85 e 100°C) obtidas em cadinho de platina, sob atmosfera dinâmica de ar a 50 mL/min para o candidato a MR de mexilhão

FIGURA 4.4.4 Curvas TG isotérmicas a 85 °C, obtidas em cadinho de platina, sob atmosfera dinâmica de ar a 50 mL/min para três sub-amostras do frasco 73 do candidato a MR de mexilhão

Foram obtidas curvas isotérmicas a 85 °C para os frascos nº 10, 73 e 153, em triplicata, como exemplificado para o frasco 73 na FIG 4.4.4. A perda de massa média obtida após 40 min de ensaio foi $3,17 \pm 0,21 \%$ ($n = 9$). Este valor foi tomado como estimativa do teor de umidade residual do lote do candidato a MR de mexilhão e é considerado adequado no que se refere à estabilidade do material em relação à degradação microbiológica. Ficou definido que os usuários devem determinar a umidade residual em

estufa, na temperatura de 85 °C, até massa constante, em alíquota que não será utilizada para a determinação dos elementos de interesse.

Na TAB 4.4.1 são apresentados os resultados obtidos para a determinação de umidade por secagem em estufa para os frascos nº 10, 73 e 153. Foi observado que o resultado médio de $3,84 \pm 0,11 \%$ ($n = 9$) é pouco mais alto do que o obtido a partir das curvas TG/DTG. É possível que variações de temperatura na estufa tenham causado esta diferença. Ainda assim, pelo amplo acesso ao método pela maioria dos laboratórios químicos, pode-se considerar o método de secagem em estufa adequado para a determinação da umidade residual em amostras biológicas. Ambos os resultados foram pouco mais altos que os obtidos em laboratório comercial, 3,03 % de umidade, conforme apresentado na TAB 4.3.1 (CETAL, 2008).

TABELA 4.4.1 Umidade residual no candidato a MR de mexilhão determinado em estufa a 85°C por 24h

Frasco	Umidade ^a , %	Número de determinações
10	$3,91 \pm 0,02$	3
73	$3,82 \pm 0,14$	3
153	$3,78 \pm 0,13$	3
Valor médio	$3,84 \pm 0,11$	9

^amédia e desvio padrão de n determinações

Na TAB 4.4.2 são apresentados os resultados obtidos para a determinação de água pelo método de Karl Fischer.

Foi observado que o teor de água determinado por Karl Fischer foi mais alto, se comparado com os resultados obtidos por TG e em estufa. É possível que exista água ligada à matriz do candidato a MR de mexilhão que seja liberada somente durante a decomposição do material e não a temperaturas mais baixas. Por outro lado, apesar dos cuidados tomados no armazenamento e transporte do material, há a possibilidade de que as sub-amostras utilizadas tenham absorvido água anteriormente à análise por Karl Fischer. De qualquer forma, ainda que o método de Karl Fischer seja usualmente aceito como o método para a determinação de “teor de água total”, independente da forma ligação, o

método não está universalmente disponível nos laboratórios, e, portanto, dá-se preferência ao método de estufa, apesar de suas limitações (ZEILLER e col, 2007).

TABELA 4.4.2 Teor de água no candidato a MR de mexilhão determinado pelo método de Karl Fischer.

Frasco	Teor de água, %
10	6,7
73	6,1
153	7,5
Valor médio	6,8

Quanto à atividade de água, o valor obtido foi 0,095 (CETAL, 2008). Esse valor pode ser considerado baixo, inferior ao observado para frutas secas, entre 0,51 a 0,89 (GUIMARÃES e col., 2008), o que demonstra que não há água disponível no material para o desenvolvimento de microorganismos.

4.5 Caracterização granulométrica

São apresentados na Tabela 4.5.1 os resultados de peneiramento para o candidato a MR de mexilhão antes do envase. Foi observado que 15 % do material apresenta granulometria inferior a 74 μm , indicando que a distribuição granulométrica do material é estreita, entre 74 μm e 105 μm . Os resultados obtidos por difração a laser, muito mais precisos, apresentados na sequência, estão de acordo com essas observações.

TABELA 4.5.1 Frações peneiradas do candidato a MR de mexilhão

Abertura de malha	Massa peneirada, g	Fração de massa, %
105 μm (150 mesh)	15,06	100
74 μm (200 mesh)	2,27	15,1
63 μm (250 mesh)	1,52	10,1
53 μm (270 mesh)	1,12	7,4

Durante os testes realizados para a caracterização granulométrica por difração de laser, foi observado que a água não seria agente dispersante ideal para análise do material, uma vez que houve formação de aglomerados nesse agente. Isopropanol anidro mostrou-se agente dispersante adequado. Além disso, foi verificado que processos de ultrassonicação e utilização de agentes dispersantes adicionais não alteraram o perfil das curvas de distribuição, não sendo portanto utilizados nesse estudo.

Na FIG 4.5.1 apresenta-se o perfil de distribuição granulométrica típica do candidato a MR de mexilhão. Já na FIG 4.5.2 é apresentada a comparação das distribuições de diversas porções do material. Observou-se que a distribuição granulométrica das diversas frações coincidiu com o esperado, considerando-se a malha das peneiras utilizadas na obtenção das frações. O candidato a material de referência apresenta tamanho médio de partícula de $\mu = 94,6 \pm 0,8 \mu\text{m}$, sendo sua distribuição granulométrica normal ($R^2 = 0,97$ para ajuste de curva gaussiana), conforme apresentado na FIG 4.5.3. O ajuste da curva normal foi realizado utilizando-se o programa Origin 7.5 SR6 v. 7.5885 (OriginLab Corporation). Este resultado é muito importante, pois distribuições granulométricas com desvios muito acentuados da normalidade ou distribuições multimodais podem inviabilizar a homogeneidade de candidatos a MR (KRAMER e col., 2001).

A FIG 4.5.4 apresenta a distribuição granulométrica sobreposta de três frascos do candidato a MR de mexilhão, escolhidos do início, do meio e do fim do processo de envase. Observou-se grande semelhança entre as distribuições granulométricas dos frascos. Este fato comprova que o processo de envase foi satisfatório, demonstrando que há homogeneidade entre os frascos do material no que se refere à granulometria.

A comparação com os resultados obtidos para MRCs de matriz similar mostrou que o candidato a MR de mexilhão apresenta distribuição semelhante à do MRC de homogeneizado de peixe (IAEA-407), como apresentado na FIG 4.5.5. Também foi observado que os demais MRC apresentam granulometria mais fina, resultado da aplicação de processo de moagem diferente no preparo desses materiais.

FIGURA 4.5.1 Perfil da distribuição granulométrica obtida para o frasco 52

FIGURA 4.5.2 Perfil das distribuições granulométricas obtidas para frações com várias granulometrias

FIGURA 4.5.3 Ajuste de curva gaussiana à distribuição granulométrica do candidato a material de referência de mexilhão

FIGURA 4.5.4 Distribuição granulométrica para os frascos 52, 100 e 162

FIGURA 4.5.5 Comparação da distribuição granulométrica do candidato a material de referência de mexilhão e diversos MRCs

A partir dos vários resultados de granulometria apresentados, pode-se afirmar que o lote do material apresenta granulometria adequada para ser utilizado como material de referência certificado.

4.6 Caracterização de elementos de interesse

Devido à grande quantidade de resultados experimentais obtidos, optou-se por não apresentar resultados individuais, mas sim valores médios e representativos para o entendimento do trabalho.

4.6.1 Validação de métodos analíticos

Neste item são apresentados os estudos realizados para validação e controle de qualidade dos resultados analíticos obtidos no LAN.

4.6.1.1 Análise por ativação neutrônica instrumental

4.6.1.1.1 Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção, L_D , e o limite de quantificação, L_Q , são características de desempenho importantes para processos de medição. O primeiro está relacionado ao valor mínimo que pode ser detectado por um método analítico, com determinada probabilidade, enquanto o segundo se relaciona à menor quantidade do analito possível de ser quantificada pelo método analítico em uma amostra, com grau de confiança especificado (CURRIE, 1999).

Em NAA, as condições de irradiação, de decaimento e de medição, bem como situações de interferência, incluindo a radiação de fundo e o contínuo Compton de energias de raios gama, podem influenciar nos valores dos limites de detecção e quantificação. Na prática, L_D e L_Q são calculados a partir da estatística de contagem da matriz da amostra, cuja contribuição para o contínuo Compton sob o pico de raio gama independe do analito, sendo usualmente denominado de área da base do pico.

Os limites de detecção e quantificação foram estimados seguindo-se o método proposto por Currie (CURRIE, 1999), de acordo com as Equações 4.2 a 4.4:

$$L_D = 3,29 \sigma_0 \quad (4.2)$$

$$L_Q = 10 \sigma_0 \quad (4.3)$$

$$\sigma_0 = \frac{\sqrt{RF}}{t_v} \quad (4.4)$$

onde:

RF é o número de contagens da radiação de fundo sob o pico do analito;

t_v é o tempo total de medição da amostra (tempo vivo).

Na TAB 4.6.1.1 são apresentados os limites de detecção, L_D , e de quantificação, L_Q , obtidos por INAA para a matriz de mexilhão, para as condições de análise utilizadas neste trabalho. Os limites de detecção e quantificação foram considerados adequados para a determinação de todos os elementos na matriz de mexilhão, uma vez que foram obtidas concentrações para os elementos no candidato a MR de mexilhão com valores bem mais altos do que os estimados para os limites de quantificação.

TABELA 4.6.1.1 Limites de detecção, L_D , e de quantificação, L_Q , em mg kg^{-1} , determinados por INAA, com utilização de 0,150 g de amostra de candidato a material de referência de mexilhão (CURRIE, 1999)

Elemento	L_D , mg kg^{-1}	L_Q , mg kg^{-1}
Ag	0,070	0,21
As	0,83	2,5
Br	0,73	2,2
Co	0,0074	0,023
Cr	0,13	0,38
Cs	0,014	0,042
Eu	0,0022	0,0068
Fe	4,7	14
La	0,026	0,079
Na, %	0,0033	0,010
Rb	0,21	0,63
Sc	0,00079	0,0024
Se	0,15	0,47
Th	0,013	0,038
Zn	0,29	0,87

4.6.1.1.2 Incerteza de medição associada à análise por ativação neutrônica

A expressão padronizada da incerteza associada a processos de medição tem se tornado requisito indispensável em química analítica, não só por ser exigida na acreditação de laboratórios, mas principalmente por viabilizar a interpretação correta de resultados analíticos.

A avaliação da incerteza de forma sistematizada consiste das seguintes etapas: especificação do mensurando; identificação das fontes de incerteza; quantificação das contribuições de cada fonte de incerteza; combinação das contribuições para o cálculo da incerteza padrão combinada; aplicação do fator de abrangência, k , para o cálculo da incerteza padrão expandida, U , e, finalmente, apresentação dos resultados (ABNT/INMETRO/SBM, 2003; EURACHEM/CITAC, 2000).

Neste estudo, os mensurandos são as concentrações de Ag, As, Br, Co, Cr, Cs, Eu, Fe, La, Na, Rb, Sc, Se, Th e Zn no candidato a material de referência de mexilhão, determinados pelo método relativo de INAA.

Na Equação 4.5 são apresentadas as grandezas de entrada para o cálculo de concentração pelo método comparativo de INAA, enquanto que na FIG 4.6.1.1 são apresentadas as fontes de incerteza associadas a cada uma dessas grandezas (MOREIRA e col., 2006):

$$C = \frac{m A_u e^{\lambda(t_u - t_s)}}{M A_s} \quad (4.5)$$

onde:

m é a massa do elemento a ser determinado no padrão;

M é a massa da amostra;

A_u é a atividade da amostra;

A_s é a atividade do elemento no padrão;

t_u é o tempo de decaimento da amostra;

t_s é o tempo de decaimento do padrão;

λ é a constante de decaimento, dada por $\lambda = \ln 2 / T_{1/2}$ e

$T_{1/2}$ é a meia vida do elemento a ser determinado.

FIGURA 4.6.1.1 Diagrama de causa e efeito para a determinação de elementos por INAA

As contribuições das diversas fontes de incerteza foram avaliadas e combinadas de forma a se obterem as estimativas da incerteza padrão combinada e da incerteza padrão expandida para o candidato a MR de mexilhão. Foi observado que a atividade da amostra foi a fonte de incerteza mais importante, sendo a estatística de contagem das radiações gama induzidas a maior contribuição para a incerteza na atividade.

Na TAB 4.6.1.2 são apresentados resultados típicos de concentração obtidos para o candidato a MR de mexilhão por INAA. Com exceção dos resultados para Cr e Eu, foi observado que a incerteza padrão expandida relativa, $U \%$, foi inferior a 10 % para todos os elementos, indicando que o método de INAA utilizado é apropriado para a determinação desses elementos na matriz de mexilhão nas concentrações observadas.

Ainda que a comparação de incertezas expandidas e intervalos de confiança para médias de medições não seja completamente adequado, por se tratarem de maneiras distintas de se abordar a confiabilidade em resultados de medição, foi observado que para a maioria dos elementos, a estimativa das incertezas expandidas são da mesma ordem de grandeza dos intervalos de confiança obtidos por INAA no LAN, apresentados em itens posteriores desse trabalho. A partir dessa observação, pode-se inferir que as estimativas das incertezas expandidas foram adequadas.

TABELA 4.6.1.2 Concentrações dos elementos, em mg kg^{-1} , obtidas por INAA, para sub-amostra do frasco 143, com incertezas associadas (base úmida)^a

Elemento	Concentração ^a , mg kg^{-1}	U , %
Ag	$2,373 \pm 0,098$	4,1
As	$13,41 \pm 0,46$	3,4
Br	$174,6 \pm 8,7$	5,0
Co	$0,816 \pm 0,021$	2,6
Cr	$1,091 \pm 0,17$	15
Cs	$0,123 \pm 0,011$	9,0
Eu	$0,0291 \pm 0,0060$	21
Fe	592 ± 23	3,9
La	$0,702 \pm 0,052$	7,4
Na, %	$1,813 \pm 0,022$	1,2
Rb	$4,32 \pm 0,45$	10
Sc	$0,1950 \pm 0,0038$	2,0
Se	$4,52 \pm 0,24$	5,4
Th	$0,268 \pm 0,016$	6,0
Zn	$116,8 \pm 2,2$	1,9

^aincertezas apresentadas são incertezas expandidas, calculadas usando-se fator de abrangência $k = 2$, que fornece nível de confiança de aproximadamente 95 %

4.6.1.1.3 Análise de materiais de referência certificados por INAA

São apresentadas na TAB 4.6.1.3 as concentração médias obtidas por INAA para os MRCs utilizados nas diversas etapas do trabalho, bem como os respectivos valores certificados (NIST, 1998, 2001; NRCC, 1999, 2002; IAEA, 2003). Pode-se observar que alguns elementos não foram determinados no LAN para esses MRCs e que para vários elementos, não há informação sobre valores certificados. Para comparação na forma gráfica dos resultados obtidos com os valores certificados, foram calculados, de acordo com a Equação 4.6, os valores de escore z para cada MRC, apresentados na FIG 4.6.1.2:

$$z = \frac{C - C_{\text{cert}}}{U_{\text{cert}}} \quad (4.6)$$

onde:

C é a concentração obtida pelo laboratório;

C_{cert} é o valor certificado;

U_{cert} é a incerteza expandida do valor certificado.

TABELA 4.6.1.3 Concentrações médias dos elementos, em mg kg^{-1} , obtidas por INAA, para os materiais de referência certificados utilizados neste trabalho^a

Elemento	NIST 2976	NIST 1566b	DORM-2	DOLT-3	IAEA-407
Ag	ND (0,011 $\pm$ 0,005)	0,658 $\pm$ 0,027 (0,666 $\pm$ 0,009)	ND (0,041 $\pm$ 0,013)	1,334 $\pm$ 0,055 (1,20 $\pm$ 0,07)	ND (0,1 $\pm$ 0,04)
As	15,67 $\pm$ 0,53 (13,3 $\pm$ 1,8)	7,27 $\pm$ 0,25 (7,65 $\pm$ 0,65)	17,40 $\pm$ 0,59 (18,0 $\pm$ 1,1)	10,21 $\pm$ 0,35 (10,2 $\pm$ 0,5)	12,30 $\pm$ 0,42 (12,6 $\pm$ 0,3)
Br	226 $\pm$ 11 (329 $\pm$ 15)	46,5 $\pm$ 2,3 -	28,2 $\pm$ 1,4 -	16,58 $\pm$ 0,83 -	81,8 $\pm$ 4,1 (94 $\pm$ 8)
Co	0,667 $\pm$ 0,017 (0,61 $\pm$ 0,02)	0,371 $\pm$ 0,010 (0,371 $\pm$ 0,09)	0,2007 $\pm$ 0,0052 (0,182 $\pm$ 0,031)	0,3265 $\pm$ 0,0085 -	0,0959 $\pm$ 0,0025 (0,10 $\pm$ 0,01)
Cr	0,485 $\pm$ 0,13 (0,50 $\pm$ 0,16)	0,440 $\pm$ 0,011 -	32,07 $\pm$ 0,83 (34,7 $\pm$ 5,5)	5,27 $\pm$ 0,14 -	0,645 $\pm$ 0,017 (0,73 $\pm$ 0,06)
Cs	0,025 $\pm$ 0,009 (0,027 $\pm$ 0,001)	ND -	0,261 $\pm$ 0,024 -	0,130 $\pm$ 0,012 -	0,0895 $\pm$ 0,0081 -
Fe	174,9 $\pm$ 6,8 (171,0 $\pm$ 4,9)	193,1 $\pm$ 7,5 (205,8 $\pm$ 6,8)	142,9 $\pm$ 5,6 (142 $\pm$ 10)	1562 $\pm$ 61 (1484 $\pm$ 57)	146,8 $\pm$ 5,7 (146 $\pm$ 3)
La	ND -	0,132 $\pm$ 0,010 -	ND -	ND -	ND -
Na, %	3,0 $\pm$ 0,2 (3,5 $\pm$ 0,1)	0,2965 $\pm$ 0,0036 (0,3297 $\pm$ 0,0053)	0,4600 $\pm$ 0,00055 -	0,955 $\pm$ 0,011 -	1,300 $\pm$ 0,016 (1,31 $\pm$ 0,07)
Rb	4,37 $\pm$ 0,44 (4,14 $\pm$ 0,09)	3,10 $\pm$ 0,31 (3,262 $\pm$ 0,145)	5,26 $\pm$ 0,53 -	3,88 $\pm$ 0,39 -	2,52 $\pm$ 0,25 (2,86 $\pm$ 0,41)
Sc	0,01485 $\pm$ 0,0030 (0,0146 $\pm$ 0,0003)	0,0624 $\pm$ 0,0012 -	ND -	0,004484 $\pm$ 0,000090 -	0,003577 $\pm$ 0,000072 -
Se	1,98 $\pm$ 0,11 (1,80 $\pm$ 0,15)	2,06 $\pm$ 0,14 (2,06 $\pm$ 0,15)	1,393 $\pm$ 0,075 (1,40 $\pm$ 0,09)	7,66 $\pm$ 0,41 (7,06 $\pm$ 0,48)	2,61 $\pm$ 0,14 (2,83 $\pm$ 0,13)
Zn	144,4 $\pm$ 2,7 (137 $\pm$ 13)	1398 $\pm$ 27 (1424 $\pm$ 46)	23,79 $\pm$ 0,45 (25,6 $\pm$ 2,3)	98,8 $\pm$ 1,9 (86,6 $\pm$ 2,4)	67,9 $\pm$ 1,3 (67,1 $\pm$ 0,8)

^aincertezas apresentadas são incertezas expandidas, calculadas usando-se fator de abrangência $k = 2$, que fornece nível de confiança de aproximadamente 95 %; para os valores certificados, em parênteses, valores certificados, com incertezas expandidas informadas pelos produtores; ND – não determinado

FIGURA 4.6.1.2 Escores z , ordenados por ordem crescente, calculados para as concentrações dos elementos nos materiais de referência certificados, obtidas por INAA

FIGURA 4.6.1.2 Escores z , ordenados por ordem crescente, calculados para as concentrações dos elementos nos materiais de referência certificados, obtidas por INAA - continuação

O critério de decisão para o desempenho de um laboratório é dado por (INMETRO, 2007):

$|z| \leq 2$, o resultado é considerado satisfatório;

$2 < |z| \leq 3$, o resultado é considerado questionável;

$|z| > 3$, o resultado é considerado insatisfatório.

Foi observado que para os elementos Br e Na no MRC NIST SRM 2976; Na no NIST SRM 1566b e Zn no NRCC DOLT-3, o escore z foi maior que 3, indicando a necessidade de investigação dos resultados obtidos. Por outro lado, a utilização do escore z , que leva em consideração apenas a incerteza do valor certificado, pode ser

considerado método restritivo quanto ao uso de MRCs na avaliação da exatidão de métodos analíticos e do desempenho de laboratórios, sendo que o ABNT ISO Guia 33 sugere a utilização de fatores de ajuste, escolhidos previamente pelo analista, de forma a aumentar o valor no denominador da Equação 4.6, de forma que limitações econômicas, técnicas ou outras limitações estipuladas sejam levadas em consideração (ABNT, 2002).

De modo alternativo, os escores z obtidos para todos os MRCs foram apresentados conjuntamente na FIG 4.6.1.3. Pode-se observar que os resultados obtidos para os diversos elementos nos MRCs estão distribuídos aleatoriamente nos gráficos e que a maioria dos valores ficou no intervalo de -2 a 2, indicando que de forma geral os resultados foram satisfatórios.

FIGURA 4.6.1.3 Escores z , calculados para as concentrações dos elementos nos materiais de referência certificados, obtidas por INAA e apresentados em duas escalas na ordenada

4.6.1.2 Espectrometria de absorção atômica

4.6.1.2.1 Estudo do comportamento eletrotérmico

Para a determinação de Cd e Pb por ET AAS, foi realizado estudo do comportamento eletrotérmico desses elementos na matriz de mexilhão. Foi investigada a intensidade do sinal analítico com a alteração das temperaturas de pirólise e atomização. Para a obtenção da curva de pirólise, utilizou-se a temperatura de atomização padrão do espectrômetro, sendo o inverso também válido para a obtenção da curva de atomização. As demais condições de análise, tais como volume de injeção e adição de modificadores químicos, não foram alteradas. São apresentadas na FIG 4.6.1.4 as curvas de pirólise e atomização obtidas no estudo.

FIGURA 4.6.1.4 Curvas de temperatura de pirólise e de atomização para Cd e Pb no candidato a MR de mexilhão

Foi observado que as temperaturas de pirólise recomendadas pelo fabricante do espectrômetro, 500 °C para o Cd e 850 °C para o Pb, são adequadas para a análise da matriz de mexilhão pois as respectivas absorbâncias integradas ainda não começaram a diminuir nessas temperaturas, o que indicaria perda do analito antes da etapa de medição do sinal analítico.

Por outro lado, para ambos os elementos, verificou-se que é possível a obtenção de valores de absorbância integrada mais altos em temperaturas de atomização mais baixas do que as recomendadas pelo fabricante, 1500 °C para Cd e 1600 °C para Pb, indicando que, com essas temperaturas é possível aumentar a sensibilidade do método. Contudo, optou-se em manter as temperaturas de atomização padrão do espectrômetro na análise do candidato a material de referência de mexilhão pois sensibilidade maior também implica em alturas de pico maiores, o que pode vir a comprometer a exatidão dos resultados de análise devido ao fenômeno de *rollover*⁵, em particular para o Cd, cuja faixa de linearidade em ET AAS é estreita.

4.6.1.2.2 Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção, L_D , e o limite de quantificação, L_Q , para AAS foram calculados a partir das Equações 4.7 e 4.8 (WELZ e SPERLING, 1999):

$$L_D = \frac{3\sigma_0}{a} \quad (4.7)$$

$$L_Q = \frac{10\sigma_0}{a} \quad (4.8)$$

onde:

σ_0 é o desvio padrão de dez determinações do branco analítico;

a é o coeficiente angular da curva analítica de calibração.

⁵ O fenômeno denominado *rollover* da curva analítica ocorre quando o espectrômetro não é capaz de realizar a correção Zeeman de maneira satisfatória. Massas maiores do analito acabam por fornecer o mesmo sinal analítico de massas menores, causando a perda de linearidade da curva analítica (WELZ e SPERLING, 1999).

Na TAB 4.6.1.4 são apresentados os limites de detecção, L_D , e de quantificação, L_Q , obtidos por AAS para a matriz de mexilhão, para as condições de análise utilizadas neste trabalho. Os limites de detecção e quantificação foram considerados adequados para a determinação dos três elementos na matriz de mexilhão, uma vez que, para esses elementos, foram obtidas concentrações mais elevadas que os limites de quantificação no candidato a MR de mexilhão.

TABELA 4.6.1.4 Limites de detecção, L_D , e de quantificação, L_Q , em $\mu\text{g kg}^{-1}$, determinados por AAS, com utilização de 0,350 g de amostra de candidato a material de referência de mexilhão (WELZ e SPERLING, 1999)

Elemento	$L_D, \mu\text{g kg}^{-1}$	$L_Q, \mu\text{g kg}^{-1}$
Cd	0,72	2,4
Hg	6,1	20
Pb	19	64

4.6.1.2.3 Incerteza de medição associada à espectrometria de absorção atômica

Os mensurandos são as concentrações de Cd, Hg e Pb no candidato a material de referência de mexilhão, determinados por AAS.

Na Equação 4.9 são apresentadas as grandezas de entrada para o cálculo de concentração por AAS, enquanto que na FIG 4.6.1.5 são apresentadas as fontes de incerteza associadas a cada uma dessas grandezas (MOREIRA e col., 2005):

$$C = \frac{A - b}{a} \times \frac{V}{M} \quad (4.9)$$

onde:

A é a absorbância da amostra;

a é o coeficiente angular da curva analítica;

b é o coeficiente linear da curva analítica;

V é o volume da amostra digerida;

M é a massa da amostra.

FIGURA 4.6.1.5 Diagrama de causa e efeito para a determinação de elementos por AAS

As contribuições das diversas fontes de incerteza foram avaliadas e combinadas de forma a se obterem as estimativas da incerteza padrão combinada e da incerteza padrão expandida para o candidato a MR de mexilhão. Foi observado que a contribuição da regressão linear da curva analítica foi a principal fonte de incerteza na determinação de Cd, Hg e Pb por AAS no candidato a MR de mexilhão.

Na TAB 4.6.1.5 são apresentados resultados típicos de concentração obtidos para o candidato a MR de mexilhão por AAS. A incerteza padrão expandida relativa, $U\%$, foi inferior a 6 %, para os três elementos, indicando que os métodos de ET AAS e CV AAS utilizados são adequados para a determinação desses elementos na matriz de mexilhão nas concentrações observadas.

De modo similar ao obtido para os resultados por INAA, as incertezas expandidas obtidas por AAS são da mesma ordem de grandeza dos intervalos de confiança obtidos por AAS, apresentados em itens posteriores desse estudo.

TABELA 4.6.1.5 Concentrações de Cd, Hg e Pb, em $\mu\text{g kg}^{-1}$, obtidas por AAS, para sub-amostra do frasco 143, com incertezas associadas (base úmida)^a

Elemento	Concentração ^a , $\mu\text{g kg}^{-1}$	U, %
Cd	448 ± 16	3,6
Hg	$173,6 \pm 9,2$	5,3
Pb	534 ± 28	5,2

^aincertezas apresentadas são incertezas expandidas, calculadas usando-se fator de abrangência $k = 2$, que fornece nível de confiança de aproximadamente 95 %

4.6.1.2.4 Análise de materiais de referência certificados por AAS

São apresentadas na TAB 4.6.1.6 as concentração médias obtidas por AAS para os MRCs utilizados nas diversas etapas do trabalho. Para comparação dos resultados obtidos com os valores certificados na forma gráfica, foram calculados, de acordo com a Equação 4.6, os escores z para cada MRC, apresentados na FIG 4.6.1.6.

TABELA 4.6.1.6 Concentrações médias dos elementos, em $\mu\text{g kg}^{-1}$, obtidas por AAS, para os materiais de referência certificados utilizados neste trabalho^a

Elemento	NIST 2976	NIST 1566b	IAEA-407
Cd	875 ± 32 (820 ± 160)	2309 ± 83 (2480 ± 80)	$181 \pm 6,5$ (189 ± 4)
Hg	$64,8 \pm 3,4$ ($61,0 \pm 3,6$)	$32,6 \pm 1,7$ ($37,1 \pm 1,3$)	203 ± 11 (222 ± 6)
Pb	799 ± 42 (1190 ± 180)	288 ± 15 (308 ± 9)	$149,0 \pm 7,7$ (120 ± 20)

^aincertezas apresentadas são incertezas expandidas, calculadas usando-se fator de abrangência $k = 2$, que fornece nível de confiança de aproximadamente 95 %; para os valores certificados, em parênteses, valores certificados, com incertezas expandidas informadas pelos produtores

FIGURA 4.6.1.6 Escores z , calculados para as concentrações de Cd, Hg e Pb nos materiais de referência certificados, obtidas por AAS

A maior parte dos escores z obtidos ficaram entre -2 e 2, indicando que os métodos de AAS utilizados foram satisfatórios e apresentam exatidão adequada para a caracterização do candidato a MR de mexilhão.

4.6.2 Estudo de homogeneidade entre frascos

4.6.2.1 Estudo por INAA

Apresentam-se na TAB 4.6.2.1 os resultados médios obtidos por INAA para os frascos utilizados no teste de homogeneidade entre frascos. Os resultados são apresentados em base úmida e com intervalos de confiança, IC, de 95%⁶.

TABELA 4.6.2.1 Concentrações dos elementos, em mg kg⁻¹, obtidas por INAA, para o estudo de homogeneidade entre frascos (base úmida)^a

Elemento	Frasco					
	19	40	74	112	143	156
Ag	2,28 ± 0,12	2,30 ± 0,12	2,23 ± 0,12	2,26 ± 0,11	2,48 ± 0,18	2,27 ± 0,15
As	14,32 ± 0,59	13,89 ± 0,88	13,97 ± 0,46	14,01 ± 0,57	13,85 ± 0,49	14,03 ± 0,54
Br	203 ± 12	199 ± 6	213 ± 16	207 ± 10	204 ± 8	209 ± 6
Co	0,841 ± 0,010	0,829 ± 0,036	0,820 ± 0,023	0,840 ± 0,045	0,828 ± 0,006	0,834 ± 0,028
Cr	1,086 ± 0,089	1,183 ± 0,075	1,150 ± 0,028	1,137 ± 0,065	1,100 ± 0,049	1,155 ± 0,102
Cs	0,1033 ± 0,0088	0,1078 ± 0,0090	0,1028 ± 0,0063	0,1062 ± 0,0081	0,1070 ± 0,0076	0,1130 ± 0,0116
Eu	0,0293 ± 0,0016	0,0284 ± 0,0014	0,0285 ± 0,0023	0,0296 ± 0,0022	0,0291 ± 0,0013	0,0294 ± 0,0019
Fe	602 ± 22	609 ± 22	618 ± 26	614 ± 22	592 ± 4	613 ± 19
La	0,713 ± 0,058	0,718 ± 0,059	0,718 ± 0,083	0,679 ± 0,037	0,681 ± 0,030	0,700 ± 0,050
Na, %	1,892 ± 0,081	1,872 ± 0,024	1,947 ± 0,067	1,908 ± 0,050	1,912 ± 0,061	1,950 ± 0,044
Rb	4,59 ± 0,24	4,31 ± 0,19	4,51 ± 0,23	4,64 ± 0,18	4,5 ± 0,15	4,50 ± 0,33
Sc	0,1888 ± 0,0075	0,1868 ± 0,0078	0,1836 ± 0,0047	0,1865 ± 0,0061	0,1891 ± 0,0029	0,1865 ± 0,0088
Se	4,29 ± 0,17	4,29 ± 0,20	4,26 ± 0,10	4,37 ± 0,21	4,38 ± 0,11	4,23 ± 0,16
Th	0,257 ± 0,012	0,259 ± 0,010	0,254 ± 0,023	0,254 ± 0,016	0,261 ± 0,009	0,256 ± 0,018
Zn	115,3 ± 3,7	114,8 ± 3,5	118,3 ± 3,1	115,8 ± 2,4	113,7 ± 4,6	116,9 ± 2,2

^amédia e intervalo de confiança a 95 %

⁶ Define-se intervalo de confiança por $IC = t(s/\sqrt{n})$ onde t é o valor crítico da distribuição t de Student para $\alpha/2 = 0,0025$; s é o desvio padrão dos dados e n é o número de medições (TRIOLLA, 1999).

Foi utilizada abordagem de análise de variância, ANOVA, tanto para se verificar se haviam diferenças significativas nas concentrações dos elementos ao longo dos frascos, bem como para se estimar a contribuição da variação entre frascos à incerteza combinada de certificação, a ser discutida em outro item deste estudo.

Antes da avaliação da homogeneidade do candidato a MR, os dados foram avaliados quanto à sua normalidade. Para isso, inicialmente foi realizada a verificação da existência de valores extremos no conjunto dos resultados, aplicando-se os testes de Dixon e Grubbs, a 95 % de confiança (FARRANT, 1997). Foram observados alguns valores extremos para os elementos Fe, Co e Cr, que foram eliminados para a obtenção dos valores médios dos elementos em cada frasco. Vale ressaltar que não foram observados valores extremos a 99 % de confiança.

Posteriormente, foi aplicada uma técnica de Análise Exploratória de Dados, EDA, para avaliar o perfil de distribuição dos resultados, utilizando-se o programa Dataplot (NIST e SEMATECH, 2009). A partir dos dados experimentais, o programa constrói uma série de quatro gráficos (*4-plot*): o gráfico sequencial dos resultados; o gráfico da variação entre resultados adjacentes (*lag plot*), o histograma e o gráfico de probabilidade normal.

Com o gráfico sequencial dos resultados, é possível verificar se esses são distribuídos ao longo de um valor médio e se a amplitude de variação é mais ou menos constante. Quaisquer padrões observados no gráfico da variação entre resultados adjacentes irão mostrar que há componente não aleatório na variação dos resultados. O histograma e o gráfico da probabilidade normal são usados para verificar se os dados seguem a distribuição normal. A curva obtida com o gráfico de probabilidade normal é idealmente uma reta para conjuntos de dados com essa distribuição.

A partir dos quatro gráficos de EDA obtidos para o conjunto de resultados do teste de homogeneidade, apresentados na FIG 4.6.2.1 para Fe, foi possível concluir que, para a maioria dos elementos, o conjunto de dados apresenta distribuição aleatória, com histograma em forma de sino e distribuição normal. Os gráficos de EDA obtidos para os demais elementos são apresentados no Apêndice C.

FIGURA 4.6.2.1 Gráficos EDA obtidos para o estudo de homogeneidade entre frascos para Fe por INAA: a) gráfico sequencial dos resultados; b) gráfico da variação entre resultados adjacentes (*lag plot*); c) histograma e d) gráfico de probabilidade normal

Esse resultado foi corroborado pelo teste de Shapiro-Wilk para normalidade, a 95 % de confiança, conforme apresentado no Apêndice D1, calculado com o programa Origin 7.5 SR6 v. 7.5885 (OriginLab Corporation). Nesse teste, se o valor de probabilidade, valor de p , calculado para a estatística do teste, W , for maior que o nível de significância, α ($\alpha = 0,05$), considera-se que o conjunto de dados apresenta distribuição normal (ORIGINLAB, 2009).

Após o teste de normalidade, é importante verificar a existência de tendências nos resultados (ISO, 2006). Inicialmente se verifica se há alguma tendência devido ao processo de medição. Caso seja comprovada a existência de alguma tendência, o método não é adequado para o estudo da homogeneidade do material. Caso não seja verificada tendência durante o processo de medição, é verificada a existência de tendência durante o processo de envase. Se essa tendência for verificada, o MR não pode ser certificado para o

analito em questão. Para o primeiro tipo de tendência, os resultados são ordenados em função da ordem de medição e para o segundo caso esses são ordenados de acordo com a ordem dos frascos utilizados. Como ilustração, a FIG 4.6.2.2 apresenta os resultados obtidos para o Na. Para os demais elementos, os resultados são apresentados no Apêndice E1.

Ajusta-se o modelo linear aos dados e é realizado teste de significância para os coeficientes de regressão linear. A partir das estatísticas de regressão, obtidas por ANOVA, pode-se testar a hipótese de que nenhum dos coeficientes de regressão é significativo, isto é, de que $a = 0$ e $b = \bar{x}$, onde a é o coeficiente angular (inclinação) e b é o coeficiente linear (intercepto) da curva de regressão linear.

Observou-se que o coeficiente linear da FIG 4.6.2.2a é 1,91, o que corresponde à média dos 47 resultados utilizados na construção da curva. Além disso, o coeficiente angular tende a zero tanto na FIG 4.6.2.2a quanto na FIG 4.6.2.2b, indicando, juntamente com os coeficientes de determinação, R^2 , próximos de zero, que não há correlação e, portanto, tendência entre as variáveis.

Os resultados do teste de ANOVA para a regressão linear, apresentados na TAB 4.6.2.2, mostraram que, exceto para As, Co, Fe, e Th, para os quais o F calculado foi maior que F crítico, e o valor de p , menor que 0,05, o modelo linear não foi significativo a 95 % de confiança para o caso da existência de tendência durante a aquisição dos resultados. Assim, para os elementos destacados foi observada alguma tendência durante a medição dos resultados, ainda que os coeficientes de determinação indiquem que a correlação seja fraca ($R^2 < 0,1$). No entanto, ao se testar a significância do ajuste linear para os dados ordenados por frasco, o modelo linear não foi significativo para nenhum elemento.

FIGURA 4.6.2.2 Investigação de tendência no estudo de homogeneidade entre frascos do Na por INAA: a) resultados apresentados por ordem de medição com ajuste de curva linear; b) resultados apresentados por ordem de frasco com ajuste de curva linear

TABELA 4.6.2.2 Estatísticas da ANOVA da regressão linear para o estudo de homogeneidade entre frascos, para os resultados obtidos por INAA

Elemento	Ordem de medição		Ordem de frasco		$F_{0,05} (v_1, v_2)$		
	F	valor de p	F	valor de p	F_c	v_1	v_2
As	4,846	0,03	1,446	0,236	4,067	1	43
Ag	0,587	0,45	0,921	0,342	4,057	1	45
Br	0,208	0,65	1,099	0,300	4,062	1	44
Co	5,557	0,02	0,083	0,775	4,085	1	40
Cr	2,325	0,13	0,235	0,630	4,062	1	44
Cs	3,186	0,08	2,159	0,149	4,052	1	46
Eu	0,001	0,98	0,432	0,514	4,057	1	45
Fe	5,072	0,03	0,001	0,995	4,062	1	44
La	0,074	0,79	1,574	0,216	4,062	1	44
Na	0,004	0,95	3,391	0,072	4,062	1	44
Rb	1,084	0,30	0,656	0,422	4,052	1	46
Sc	1,107	0,30	0,250	0,620	4,073	1	42
Se	0,658	0,42	0,113	0,738	4,052	1	46
Th	4,442	0,04	0,057	0,813	4,062	1	44
Zn	0,251	0,62	0,002	0,967	4,052	1	46

Finalmente, o teste de ANOVA, realizado com as médias obtidas para cada elemento em cada frasco, testou a hipótese de que os resultados provêm de populações com a mesma média. O resultado do teste de ANOVA mostrou que, exceto para Ag, não há evidências para rejeitar a hipótese de que não há diferença entre os resultados obtidos para os diversos frascos e, portanto, pode-se considerar que as concentrações dos elementos são homogêneas ao longo dos frascos do candidato a MR de mexilhão, conforme mostrado na TAB 4.6.2.3, onde F é menor do que F_c para todos os elementos, com exceção da Ag.

TABELA 4.6.2.3 Estatísticas da ANOVA para os valores médios de cada frasco, obtidos por INAA, para o estudo de homogeneidade entre frascos

Elemento	Fonte de variação	Média quadrática	F	Valor de p	F_c^a
Ag	entre	0,0723	3,391	0,012	2,438
	dentro	0,0213			
As	entre	0,247	0,723	0,610	2,443
	dentro	0,342			
Br	entre	191	1,414	0,239	2,438
	dentro	135			
Co	entre	0,000499	0,504	0,771	2,438
	dentro	0,000989			
Cr	entre	0,00673	0,862	0,515	2,438
	dentro	0,00781			
Cs	entre	0,000109	1,007	0,426	2,438
	dentro	0,000108			
Eu	entre	0,00000194	0,416	0,835	2,438
	dentro	0,00000467			
Fe	entre	719	1,210	0,321	2,438
	dentro	595			
La	entre	0,00261	0,639	0,671	2,438
	dentro	0,00409			
Na	entre	0,00748	1,883	0,118	2,438
	dentro	0,00397			
Rb	entre	0,110	1,495	0,212	2,438
	dentro	0,073			
Sc	entre	0,0000879	1,925	0,110	2,438
	dentro	0,0000457			
Se	entre	0,0367	1,138	0,355	2,438
	dentro	0,0323			
Th	entre	0,0000934	0,345	0,882	2,449
	dentro	0,000271			
Zn	entre	20,51	1,263	0,298	2,438
	dentro	16,24			

^a F_c para $\alpha = 0,05$; $v_1 = 5$ $v_2 = 42$

4.6.2.2 Estudo por INAA, com utilização de fotopicos complementares

Para a determinação de um elemento pelo método comparativo de INAA, a atividade obtida de um fotopico de decaimento de raio gama apropriado, o fotopico analítico, é comparada com a atividade do mesmo fotopico para o padrão do elemento. Tal fotopico é selecionado de acordo com a resolução (medida pela largura total à meia altura, FWHM), intensidade (boa estatística de contagem) e ausência de interferências, sendo que os manuais de INAA fazem recomendação dos fotopicos analíticos apropriados (EHMANN, 1991).

É possível utilizar fotopicos de raios gama complementares, para os radionuclídeos que os possuem, para confirmar resultados obtidos por INAA com os fotopicos analíticos. No contexto da avaliação da homogeneidade, o uso desses fotopicos é interessante, uma vez que a precisão dos resultados é mais importante que a exatidão, e os dados obtidos podem ser utilizados para confirmar os resultados obtidos com os fotopicos analíticos.

Nesse trabalho, foram utilizados os fotopicos complementares dos radionuclídeos ^{110m}Ag , ^{82}Br , ^{60}Co , ^{134}Cs , ^{152}Eu , ^{59}Fe , ^{140}La , ^{233}Pa , ^{46}Sc e ^{75}Se (descritos na TAB 3.3) no estudo de homogeneidade entre frascos do candidato a material de referência de mexilhão por INAA (MOREIRA e col., 2010a). Utilizaram-se diagramas de caixa (*box-plots*), construídos utilizando-se o programa Origin 7.5 SR6 v. 7.5885 (OriginLab Cooperation), para inspeção visual das concentrações dos elementos calculadas com os vários fotopicos. A ANOVA foi utilizada para avaliação dos resultados.

São apresentados na FIG 4.6.2.3 os diagramas de caixa para a distribuição dos resultados de concentração calculados a partir de diferentes fotopicos. Ainda que tenham sido observadas discrepâncias entre os resultados obtidos para cada fotopico, tanto a média e a mediana quanto os intervalos interquartis obtidos são da mesma ordem de grandeza para a maioria dos elementos e fotopicos analisados. Os elementos Eu, La, Se e Th foram as exceções. No caso do Eu, foram observadas interferências positivas para os fotopicos de 121 keV e 964 keV, o que resultou em concentrações mais elevadas para esses fotopicos. No caso do fotopico de 279,74 keV do Se, a concentração mais elevada está relacionada à interferência do fotopico de 279,30 keV do radionuclídeo ^{203}Hg .

FIGURA 4.6.2.3 Diagramas de caixa para os resultados do estudo de homogeneidade entre frascos por INAA para oito sub-amostras, utilizando-se fotopicos de energias diferentes

FIGURA 4.6.2.3 Diagramas de caixa para os resultados do estudo de homogeneidade entre frascos por INAA para oito sub-amostras, utilizando-se fotopicos de energias diferentes - continuação

Para os radionuclídeos cujos fotopicos estão na mesma região do espectro e com estatística de contagem similar, tais como Co, Cs, Fe e Sc, a concordância dos resultados é muito maior, o que sugere que, ao menos para a matriz de mexilhão, quaisquer dos fotopicos poderiam ser utilizados na determinação desses elementos.

Na TAB 4.6.2.4 são apresentados os resultados de ANOVA obtidos para a concentração média de oito sub-amostras para seis frascos. O teste de ANOVA foi realizado para os resultados obtidos com cada fotopico de raio gama para cada radionuclídeo.

Com exceção dos resultados obtidos para ^{110m}Ag , F foi menor que F_c para todos os fotopicos analíticos, como já discutido no item anterior desse trabalho, indicando que o candidato a material de referência de mexilhão pode ser considerado homogêneo para os elementos investigados. No entanto, para os demais fotopicos do ^{110m}Ag , F foi

menor que F_c , o que indica que o material também pode ser considerado homogêneo para a prata. Esses resultados demonstram a utilidade de aplicar as energias de raios gama complementares em estudos de homogeneidade por INAA.

Para os fotopicos de 329 keV (^{140}La) e 779 keV (^{152}Eu), foi observado que F foi maior que F_c , indicando não homogeneidade. Foram obtidas estatísticas de contagem muito baixas para esses fotopicos e, portanto, com grande incerteza associada. Por essa razão, os resultados de ANOVA para esses fotopicos não devem ser considerados confiáveis.

TABELA 4.6.2.4 Estatísticas da ANOVA para os valores médios de cada frasco, obtidos por INAA, para o estudo de homogeneidade entre frascos, utilizando-se fotopicos de energias diferentes

Nuclideo	Energia, keV	F	Valor de p	F_c^a	Nuclideo	Energia, keV	F	Valor de p	F_c^a
^{110m}Ag	657,76	3,391	0,012	2,438	^{152}Eu	121,78	0,793	0,561	2,438
	677,62	1,068	0,392	2,438		344,29	0,838	0,530	2,438
	706,68	0,894	0,494	2,438		778,92	3,616	0,008	2,438
	763,94	0,845	0,526	2,438		964,11	1,303	0,281	2,438
	884,69	0,586	0,711	2,438		1085,89	0,968	0,449	2,438
	937,49	1,978	0,102	2,438		1408,00	0,416	0,835	2,438
	1384,30	0,323	0,896	2,438	^{59}Fe	1099,25	1,210	0,321	2,438
	1505,40	1,843	0,125	2,438		1291,50	1,982	0,101	2,438
^{82}Br	554,35	1,366	0,257	2,438	^{140}La	328,76	2,811	0,028	2,438
	619,11	1,547	0,196	2,438		487,02	0,968	0,449	2,438
	698,37	2,172	0,075	2,438		815,77	1,548	0,196	2,438
	776,52	1,414	0,239	2,438		1596,21	0,639	0,671	2,438
	827,83	0,700	0,627	2,438	^{233}Pa	300,18	1,391	0,247	2,438
	1044,08	1,300	0,282	2,438		312,01	0,345	0,883	2,438
	1317,47	0,552	0,736	2,438	^{46}Sc	889,28	1,925	0,110	2,438
^{60}Co	1173,24	0,732	0,604	2,438		1220,55	1,094	0,378	2,438
	1332,50	0,504	0,771	2,438	^{75}Se	136,01	0,389	0,853	2,438
^{134}Cs	604,70	1,007	0,426	2,438		264,66	1,138	0,355	2,438
	795,85	0,565	0,726	2,438		279,54	3,371	0,012	2,438

^a F_c para $\alpha = 0,05$; $\nu_1 = 5$; $\nu_2 = 42$

4.6.2.3 Estudo por k_0 -INAA

São apresentados na TAB 4.6.2.5 os resultados médios em base úmida obtidos por k_0 -INAA para os frascos utilizados no teste de homogeneidade entre frascos. Valores extremos foram eliminados previamente à confecção da tabela.

Para alguns dos frascos analisados, os conjuntos de resultados para os elementos Al, Br, Cl, Mn e Na foram considerados não normais no nível de significância de 5 % no teste de normalidade de Shapiro-Wilk, conforme apresentado no Apêndice D2. Ainda assim, decidiu-se dar continuidade aos testes de ANOVA.

TABELA 4.6.2.5 Concentrações de elementos, obtidas por k_0 -INAA, para o estudo de homogeneidade entre frascos (base úmida)^a

Elemento	Frasco		
	11	33	161
Al, mg kg ⁻¹	48,8 ± 6,1	50,4 ± 8,1	54,2 ± 5,5
Br, mg kg ⁻¹	184 ± 9	176 ± 28	193 ± 12
Cl, %	3,30 ± 0,08	3,13 ± 0,49	3,41 ± 0,20
K, %	0,76 ± 0,08	0,74 ± 0,13	0,68 ± 0,25
Mg, %	0,236 ± 0,022	0,242 ± 0,039	0,256 ± 0,040
Mn, mg kg ⁻¹	24,8 ± 3,2	24,2 ± 6,2	26,5 ± 8,1
Na, %	2,01 ± 0,04	2,00 ± 0,09	2,04 ± 0,10
V, mg kg ⁻¹	1,49 ± 0,14	1,46 ± 0,20	1,64 ± 0,21

^amédia e intervalo de confiança a 95 %

Na FIG 4.6.2.4 são apresentados os resultados para o teste de tendência para vanádio. De maneira semelhante ao concluído no estudo de INAA, foi possível observar que não houve tendência nos resultados obtidos por k_0 -INAA, nem por ordem de medição, nem por ordem de frasco, como observado para o vanádio, pois de maneira geral, R^2 tendeu a zero, a assumiu valores próximos de zero e b se apresentou próximo à média dos valores. Apresenta-se no Apêndice E2 os gráficos para os demais elementos.

FIGURA 4.6.2.4 Investigação de tendência no estudo de homogeneidade entre frascos do V por k_0 -INAA: a) resultados apresentados por ordem de medição com ajuste de curva linear; b) resultados apresentados por ordem de frasco com ajuste de curva linear

Os resultados do teste de ANOVA para a regressão linear, apresentados na TAB 4.6.2.6, mostraram que, para todos os elementos analisados por k_0 -INAA, F calculado foi menor que F crítico, e o valor de p , menor que 0,05. Portanto, não foi verificada tendência, nem durante o processo de medição, nem em função da ordem de frasco, o que confirma as conclusões obtidas a partir dos gráficos de regressão linear.

TABELA 4.6.2.6 Estatísticas da ANOVA da regressão linear para o estudo de homogeneidade entre frascos, para os resultados obtidos por k_0 -INAA

Elemento	Ordem de medição		Ordem de frasco		$F_{0,05 (v_1, v_2)}$		
	F	valor de p	F	valor de p	F_c	v_1	v_2
Al	0,0000063	0,988	3,242	0,093	4,600	1	14
Br	2,022	0,179	3,047	0,104	4,667	1	13
Cl	0,622	0,444	2,142	0,167	4,667	1	13
K	0,121	0,733	0,568	0,465	4,667	1	13
Mg	0,284	0,603	0,921	0,354	4,600	1	14
Mn	0,325	0,579	0,279	0,607	4,747	1	12
Na	0,305	0,590	0,826	0,380	4,667	1	13
V	0,021	0,887	4,291	0,057	4,600	1	14

Para o teste de ANOVA realizado para verificar se os resultados provêm de populações com a mesma média, observou-se que F foi menor que F_c para todos os elementos analisados por k_0 -INAA, conforme mostrado na TAB 4.6.2.7. Assim, pode-se considerar que as concentrações dos elementos investigados são homogêneas ao longo dos frascos do candidato a MR de mexilhão.

TABELA 4.6.2.7 Estatísticas da ANOVA para os valores médios de cada frasco, obtidos por k_0 -INAA, para o estudo de homogeneidade entre frascos

Elemento	Fonte de variação	Média Quadrática	F	Valor de p	F_c^a
Al	entre	46,5	1,470	0,261	3,682
	dentro	31,6			
Br	entre	470	2,293	0,135	3,682
	dentro	205			
Cl	entre	0,117	2,122	0,154	3,682
	dentro	0,055			
K	entre	0,0090	0,584	0,570	3,682
	dentro	0,0154			
Mg	entre	0,000583	0,647	0,538	3,682
	dentro	0,000901			
Mn	entre	8,6	0,489	0,623	3,682
	dentro	17,5			
Na	entre	0,00338	0,786	0,474	3,682
	dentro	0,00430			
V	entre	0,0587	2,236	0,141	3,682
	dentro	0,0263			

^a F_c para $\alpha = 0,05$; $\nu_1 = 2$ $\nu_2 = 15$

4.6.2.4 Estudo por AAS

São apresentados na TAB 4.6.2.8 os resultados médios em base úmida obtidos por AAS para os frascos utilizados no estudo de homogeneidade entre frascos.

TABELA 4.6.2.8 Concentrações de elementos, em $\mu\text{g kg}^{-1}$, obtidas por AAS, para o estudo de homogeneidade entre frascos (base úmida)^a

Elemento	Frasco					
	19	40	74	112	143	156
Hg	186 $\pm$ 18	190 $\pm$ 13	179 $\pm$ 4	177 $\pm$ 12	188 $\pm$ 27	189 $\pm$ 24
Cd	449,0 $\pm$ 7,3	450,6 $\pm$ 5,9	451,0 $\pm$ 3,1	444,9 $\pm$ 5,7	445,6 $\pm$ 4,3	449,6 $\pm$ 9,3
Pb	485 $\pm$ 30	494 $\pm$ 13	511 $\pm$ 21	521 $\pm$ 36	533 $\pm$ 43	508 $\pm$ 48

^amédia e intervalo de confiança a 95 %

Todos os conjuntos de resultados foram considerados normais no nível de significância 0,05 no teste de normalidade de Shapiro-Wilk, conforme apresentado no Apêndice D3.

Na FIG 4.6.2.5 são apresentados os resultados para o teste de tendência realizado para mercúrio. Ainda que pouco acentuada, observou-se tendência nos resultados na ordem de medição (FIG. 4.6.2.5a), que pode estar relacionado a flutuações no sinal do espectrômetro. Contudo, não foi observada tendência na ordem de frasco. Padrões semelhantes foram observados para cádmio e chumbo, apresentados no Apêndice E3.

É conveniente comentar que esse resultado foi obtido mesmo com a utilização da técnica de “*re-slope*”, que consiste em fazer nova medição de um ou mais soluções padrão após a determinação de certo número de amostras (entre dez e vinte) com o intuito de se verificar a estabilidade do sinal da curva analítica. Cabe ressaltar que, na maioria das vezes, a nova medição do sinal do padrão não alterou significativamente os coeficientes da curva analítica, demonstrando a estabilidade do sinal analítico detectado pelos espectrômetros.

Os resultados do teste de ANOVA para a regressão linear, apresentados na TAB 4.6.2.9 para os resultados obtidos por AAS, mostraram que não houve tendência nos resultados obtidos para mercúrio e cádmio, ainda que F calculado para mercúrio seja pouco menor que F crítico para os resultados na ordem de medição. No entanto, foi observada tendência nos resultados de chumbo no que se refere à ordem de medição, uma vez que, nesse caso F calculado foi maior que F crítico. Ainda assim, como a correlação foi fraca ($R^2 = 0,06$), deu-se continuidade à ANOVA. Não foi verificada tendência por ordem de frasco para os resultados dos três elementos.

Para verificação de que os resultados provêm de populações com a mesma média, utilizando-se ANOVA, observou-se que F foi menor que F_c para os três elementos analisados por AAS, conforme mostrado na TAB 4.6.2.10. Assim, pode-se considerar que as concentrações dos elementos investigados são homogêneas ao longo dos frascos do candidato a MR de mexilhão.

FIGURA 4.6.2.5 Investigação de tendência no estudo de homogeneidade entre frascos do Hg por AAS: a) resultados apresentados por ordem de medição com ajuste de curva linear; b) resultados apresentados por ordem de frasco com ajuste de curva linear

TABELA 4.6.2.9 Estatísticas da ANOVA da regressão linear para o estudo de homogeneidade entre frascos, para os resultados obtidos por AAS

Elemento	Ordem de medição		Ordem de frasco		$F_{0,05} (v_1, v_2)$		
	F	valor de p	F	valor de p	F_c	v_1	N_2
Hg	4,066	0,050	0,151	0,699	4,067	1	43
Cd	0,259	0,613	1,315	0,258	4,067	1	43
Pb	4,806	0,033	2,991	0,091	4,062	1	44

TABELA 4.6.2.10 Estatísticas da ANOVA para os valores médios de cada frasco, obtidos por AAS, para o estudo de homogeneidade entre frascos

Elemento	Fonte de variação	Média Quadrática	F	Valor de p	F_c^a
Hg	entre	236	0,695	0,630	2,438
	dentro	340			
Cd	entre	53,4	1,218	0,317	2,438
	dentro	43,8			
Pb	entre	2449	1,470	0,220	2,438
	dentro	1666			

^a F_c para $\alpha = 0,05$; $\nu_1 = 5$ $\nu_2 = 42$

4.6.3 Estudo de homogeneidade dentro do frasco

4.6.3.1 Estudo por INAA

O frasco nº 90 foi utilizado para o estudo de homogeneidade dentro do frasco para Ag, As, Br, Co, Cr, Cs, Eu, Fe, La, Na, Rb, Sc, Se, Th e Zn por INAA, utilizando-se oito sub-amostras para as massas de 50, 150, 250, 350 e 500 mg.

Foi observada a diminuição dos valores de concentração com o aumento da massa para metade dos elementos analisados, em particular para os elementos com meia vida mais curta, como exemplificado na FIG 4.6.3.1 para o sódio. Para elementos de meia vida mais longa, o fenômeno foi menos acentuado ou não esteve presente, como no caso da prata, também apresentado na FIG 4.6.3.1. Deste modo, foi verificada tendência nos resultados em função da massa.

O fenômeno relaciona-se à limitação do método de INAA utilizado, possivelmente devido à elevação do tempo morto do espectrômetro de raios gama, mas também podem ter ocorrido autoabsorção da radiação gama emitida pelas sub-amostras e influência da diferença na geometria das sub-amostras com massas maiores em relação aos padrões dos elementos.

FIGURA 4.6.3.1 Investigação de tendência no estudo de homogeneidade dentro do frasco para Na e Ag, por INAA. Resultados apresentados por ordem de massa, com ajuste de curva linear

Para a análise dos resultados, valores extremos foram eliminados e realizou-se o teste de Shapiro-Wilk para normalidade a 95 % de confiança, apresentado no Apêndice D4, no qual se verificou que, com exceção de algumas massas para Br, La e Rb, os conjuntos de resultados foram considerados normais.

Como foi verificada variação na concentração obtida em função da massa de sub-amostra utilizada para diversos elementos, o teste de ANOVA foi repetido, retirando-se dados obtidos para uma dada massa, até que o conjunto de dados fosse aprovado no teste de igualdade de massas. Na TAB 4.6.3.1 são apresentados os resultados do teste de ANOVA, com exclusão de conjuntos de dados, na maior parte dos casos para a massa de 500 mg. Foi observado que, com a exclusão de resultados, houve igualdade entre as médias para os demais sub-grupos. No entanto, para os elementos de meia vida intermediária, As, Br e Na, não foi observada igualdade entre as médias de concentração,

mesmo com a exclusão de dados pois F calculado foi sempre maior que F crítico para 95 % de confiança.

TABELA 4.6.3.1 Estatísticas de ANOVA para os valores médios de cada massa, obtidos por INAA, no estudo de homogeneidade dentro do frasco

Elemento	Fonte de variação	Média quadrática	F	Valor de p	F_c	ν_1	ν_2
Ag	entre	0,0198	0,661	0,583	2,945	3	28
	dentro	0,0299					
As	entre	1,75	4,325	0,027	3,467	2	21
	dentro	0,40					
Br	entre	3112	35,323	1,91E-07	3,467	2	21
	dentro	88					
Co	entre	0,000771	0,305	0,812	2,945	3	28
	dentro	0,002558					
Cr	entre	0,0305	2,616	0,052	2,641	4	35
	dentro	0,0117					
Cs	entre	0,000148	1,662	0,198	2,947	3	28
	dentro	0,0000889					
Eu	entre	0,0000267	1,898	0,133	2,641	4	35
	dentro	0,0000141					
Fe	entre	1462	2,788	0,059	2,947	3	28
	dentro	524					
La	entre	0,0211	1,294	0,295	3,467	2	21
	dentro	0,0016					
Na	entre	0,248	18,585	2,26E-05	3,467	2	21
	dentro	0,001					
Rb	entre	0,054	0,593	0,010	2,947	3	28
	dentro	0,091					
Sc	entre	0,000101	0,810	0,499	2,947	3	28
	dentro	0,000125					
Se	entre	0,0591	0,543	0,657	2,947	3	28
	dentro	0,1089					
Th	entre	0,000538	2,904	0,052	2,947	3	28
	dentro	0,000185					
Zn	entre	54,8	2,731	0,063	2,947	3	28
	dentro	20,1					

^a F_c para $\alpha = 0,05$

A TAB 4.6.3.2 apresenta os resultados médios obtidos por INAA para o teste de homogeneidade dentro do frasco. Os resultados são apresentados em base úmida. Os valores em negrito representam conjuntos de dados que não passaram no teste de ANOVA para igualdade entre médias.

TABELA 4.6.3.2 Concentrações de elementos, em mg kg^{-1} , obtidas por INAA para massas diferentes de amostra, para o estudo de homogeneidade dentro do frasco (base úmida)^a

	50 mg	150 mg	250 mg	350 mg	500 mg
Ag	2,36 ± 0,17	2,38 ± 0,15	2,38 ± 0,12	2,27 ± 0,16	2,08 ± 0,14
As	13,90 ± 0,53	13,73 ± 0,63	14,61 ± 0,50	15,1 ± 0,63	14,5 ± 0,74
Br	227,0 ± 9,5	203,5 ± 5,1	187,8 ± 8,8	150,9 ± 14	131,2 ± 17
Co	0,841 ± 0,036	0,852 ± 0,051	0,844 ± 0,027	0,828 ± 0,060	0,756 ± 0,068
Cr	1,07 ± 0,13	1,17 ± 0,07	1,16 ± 0,05	1,11 ± 0,12	1,02 ± 0,08
Cs	0,0956 ± 0,0090	0,1101 ± 0,012	0,1071 ± 0,0044	0,1088 ± 0,0073	0,1004 ± 0,0072
Eu	0,0521 ± 0,0046	0,0529 ± 0,0026	0,0544 ± 0,0030	0,520 ± 0,0023	0,0494 ± 0,0029
Fe	612 ± 20	597 ± 14	588 ± 22	580 ± 25	553 ± 22
La	0,687 ± 0,036	0,695 ± 0,047	0,664 ± 0,018	0,631 ± 0,026	0,469 ± 0,026
Na, %	2,085 ± 0,047	1,858 ± 0,13	1,675 ± 0,036	1,506 ± 0,16	1,284 ± 0,089
Rb	4,87 ± 0,47	4,62 ± 0,16	4,63 ± 0,13	4,31 ± 0,30	4,12 ± 0,30
Sc	0,192 ± 0,010	0,192 ± 0,009	0,192 ± 0,006	0,185 ± 0,013	0,171 ± 0,012
Se	4,38 ± 0,31	4,48 ± 0,32	4,39 ± 0,18	4,27 ± 0,33	3,99 ± 0,30
Th	0,243 ± 0,014	0,262 ± 0,015	0,253 ± 0,016	0,247 ± 0,019	0,229 ± 0,017
Zn	118,4 ± 5,1	115,9 ± 4,3	113,3 ± 2,7	112,7 ± 3,0	104,0 ± 2,6

^amédia e intervalo de confiança a 95 %

Uma vez que o desvio padrão de repetitividade de um método, s_r , está sempre incluído no desvio padrão obtido para análise, a massa mínima de amostra de um MRC que deve ser utilizada para que as informações de certificação sejam válidas é aquela em que o desvio padrão relativo, DPR, obtido com determinada massa de amostra se iguala ao s_r (ISO, 2006).

Para se estimar a massa mínima de amostra necessária para análise do candidato a MR de mexilhão, foi feita comparação, na forma porcentual, entre o DPR, com a estimativa do s_r do método de INAA. Essa estimativa foi obtida a partir de adaptação de

método para se estimar a repetitividade de métodos analíticos (ISO, 2005). Utilizaram-se três sub-amostras de 150 mg, cuja determinação de elementos por INAA foi realizada em condições de repetitividade, com dez repetições da medição das radiações gamas induzidas em um mesmo espectrômetro.

Na FIG 4.6.3.2 são apresentados em forma gráfica a comparação dos resultados obtidos para elementos selecionados. Os resultados dos demais elementos são apresentados no Apêndice F.

Para os elementos Ag, As, Sc, Se e Zn, o DPR foi maior que s_r para todas as massas utilizadas no estudo e, portanto, concluiu-se que a massa mínima de amostra é inferior a 50 mg. Comportamento semelhante foi observado para os elementos Co, Fe e Th, para os quais o DPR é da mesma ordem de grandeza que s_r . Para esses elementos, também se considerou 50 mg como massa mínima. Para os elementos Cr, Cs, Eu e Rb, o DPR aumentou com a diminuição da massa utilizada, até ultrapassar o valor de s_r , indicando a massa mínima. O comportamento dos gráficos para os elementos Br, La e Na foram considerados anômalos, o que pode estar relacionado com os problemas experimentais descritos anteriormente.

Na TAB 4.6.3.3 são apresentadas as estimativas de massa mínima para os elementos determinados por INAA no estudo de homogeneidade dentro do frasco. Optou-se por utilizar valores de massa medidos experimentalmente para a definição de massas mínimas. É provável que, para diversos elementos, esses resultados sejam superestimados e possivelmente valores inferiores de massa mínima sejam viáveis por INAA, o que pode ser verificado experimentalmente com utilização de massas inferiores a 50 mg no estudo de homogeneidade entre frascos.

FIGURA 4.6.3.2 Desvio padrão relativo em função da massa para o estudo de homogeneidade dentro do frasco por INAA para elementos selecionados. Estimativa do desvio padrão de repetitividade do método (- - - - -)

TABELA 4.6.3.3 Estimativa de massa mínima do candidato a MR de mexilhão, obtidas por INAA

Elemento	Massa mínima, g
Ag	0,050
As	0,050
Br	0,050
Co	0,050
Cr	0,250
Cs	0,150
Eu	0,150
Fe	0,050
La	0,150
Na	0,050
Rb	0,350
Sc	0,050
Se	0,050
Th	0,050
Zn	0,050

4.6.3.2 Estudo por AAS

O frasco nº 12 foi utilizado para o estudo de homogeneidade dentro do frasco por AAS. Foram determinadas as concentrações dos elementos Hg, Cd e Pb de forma aleatória, utilizando-se massas de 50, 150, 200, 350 e 500 mg em oito sub-amostras para cada massa.

Os valores extremos obtidos para Hg e Cd foram eliminados antes da análise dos dados, seguindo-se os critérios de Dixon e Grubbs.

Na FIG 4.6.3.3 são apresentados os resultados para o teste de tendência realizado para chumbo. Para a massa de 50 mg, foi observado que o valor médio foi mais alto e com maior dispersão de resultados individuais. Porém, ao se eliminar esses dados da análise, houve concordância de resultados. Comportamento semelhante foi observado para o mercúrio, enquanto que para o cádmio, as diversas massas utilizadas não influenciaram no resultado de concentração obtido.

FIGURA 4.6.3.3 Investigação de tendência no estudo de homogeneidade dentro do frasco do Pb por AAS: a) resultados apresentados por ordem de medição com ajuste de curva linear; b) resultados apresentados por ordem de massa com ajuste de curva linear

Todos os conjuntos de resultados foram considerados normais no nível de significância 0,05, de acordo com o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, conforme apresentado no Apêndice D5.

Para verificação de que os resultados provêm de populações com a mesma média, utilizando-se ANOVA, observou-se que F foi menor que F_c para Cd, para todas as massas utilizadas e para Pb ao se desconsiderar as massas de 50 e 500 mg. No caso do Hg, mesmo com a exclusão dos resultados para 50 e 500 mg, F foi maior que F_c , indicando, portanto, que não há igualdade entre as médias dos resultados, para o estudo de homogeneidade dentro do frasco, conforme mostrado na TAB 4.6.3.4.

TABELA 4.6.3.4 Estatísticas da ANOVA para os valores médios de cada massa, obtidos por AAS, para o estudo de homogeneidade dentro do frasco

Elemento	Fonte de variação	Média quadrática	F	Valor de p	F_c	v_1	v_2
Hg	entre	1414	4,850	0,019	3,467	2	21
	dentro	291					
Cd	entre	534	1,361	0,268	2,641	4	35
	dentro	392					
Pb	entre	6498	2,000	0,160	3,467	2	21
	dentro	3249					

^a F_c para $\alpha = 0,05$

São apresentados na TAB 4.6.3.5 os resultados médios em base úmida obtidos por AAS para o estudo de homogeneidade dentro do frasco. Os valores em negrito representam conjuntos de dados que foram excluídos para a aplicação do teste de ANOVA com comprovação de igualdade entre médias.

TABELA 4.6.3.5 Concentrações de elementos, em $\mu\text{g kg}^{-1}$, obtidas por AAS, para massas diferentes de amostra, para o estudo de homogeneidade dentro do frasco (base úmida)^a

	50 mg	150 mg	200 mg	350 mg	500 mg
Hg	348 ± 14	264 ± 16	258 ± 13	239 ± 14	200 ± 25
Cd	497 ± 14	493 ± 10	503 ± 11	513 ± 14	509 ± 28
Pb	734 ± 129	472 ± 35	442 ± 23	499 ± 71	417 ± 28

^amédia e intervalo de confiança a 95 %

Para se estimar a massa mínima de amostra necessária para análise do candidato a MR de mexilhão, foi feita comparação, na forma porcentual, entre o DPR e a estimativa do s_r do método de AAS. Utilizou-se os dados do teste de ANOVA para se estimar o componente de dispersão devida à repetitividade do método. Na FIG 4.6.3.4 são apresentados em forma gráfica a comparação dos resultados.

FIGURA 4.6.3.4 Desvio padrão relativo em função da massa para o estudo de homogeneidade dentro do frasco por AAS. Estimativa do desvio padrão de repetitividade do método (- - - - -)

Foi observado que, tanto para Cd quanto para Hg, os valores de DPR ficaram abaixo dos valores de s_r e, assim, considerou-se 50 mg como o valor de massa mínima para esses elementos. No caso do Pb, o valor de DPR diminuiu com a concentração e tomou-se o valor de 200 mg como massa mínima para este elemento. A estimativa da massa mínima para os elementos determinados por AAS no candidato a MR de mexilhão, a partir do estudo de homogeneidade dentro do frasco estão apresentados na TAB 4.6.3.6. Optou-se por utilizar valores de massa medidos experimentalmente para a definição de massas mínimas. Da mesma forma do ocorrido para o estudo por INAA, é provável que esses resultados sejam superestimados e possivelmente valores inferiores de massa mínima sejam viáveis para Cd e Hg por AAS. O valor de massa mínima mais elevado para o Pb é reflexo dos valores de L_D e L_Q maiores obtidos para esse elemento, se comparado com os valores obtidos para Cd e Hg (TAB 4.6.1.4).

TABELA 4.6.3.6 Estimativa de massa mínima do candidato a MR de mexilhão, obtidas por AAS

Elemento	Massa mínima, g
Cd	0,050
Hg	0,050
Pb	0,200

4.6.4 Estudo de estabilidade a curto prazo

4.6.4.1 Estudo por INAA

São apresentadas na TAB 4.6.4.1 as concentrações em base úmida, obtidas por INAA, para o estudo de estabilidade a curto prazo (MOREIRA e col., 2009).

Foi realizado teste de ANOVA para a concentração média das quatro sub-amostras de cada frasco, cujos resultados estão apresentados na TAB 4.6.4.2.

Exceto para Se, o teste mostrou que, no nível de confiança de 95 %, não há diferenças significativas entre as concentrações médias obtidas para os frascos, independentemente da temperatura e do tempo de exposição a esta. Esses resultados são corroborados pelos valores de p obtidos, que, com exceção do Se, foram todos maiores que o nível de significância $\alpha = 0,05$. No nível de confiança de 99 %, os resultados para Se também foram considerados iguais, uma vez que F foi menor que F_c ($F_c = 2,678$).

Por outro lado, ao se verificar as estatísticas da ANOVA para os valores médios dos frascos armazenados a cada temperatura de teste (20, 40 e 60 °C) em relação à temperatura controle, nas TAB 4.6.4.3, 4.6.4.4 e 4.6.4.5, respectivamente, as médias e respectivas dispersões obtidas levaram o teste de ANOVA a informar que não há diferenças significativas nas médias para o Se em nenhuma das temperaturas estudadas, havendo porém diferenças entre as médias para Co e Th na temperatura de 40 °C.

Contudo, a dispersão aleatória dos dados observada na investigação gráfica de possíveis tendências ao longo do tempo apresentados na FIG 4.6.4.1 para os elementos Ag e Se, bem como as apresentadas no Apêndice G para os demais elementos, leva à conclusão de que os elementos analisados se mantiveram estáveis durante o período do estudo de estabilidade a curto prazo, mesmo para os casos em que o teste de ANOVA detectou alguma diferença entre as médias dos resultados.

TABELA 4.6.4.1 Concentrações de elementos, em mg kg⁻¹, obtidas por INAA, para o estudo de estabilidade a curto prazo (base úmida)^a

Frasco	Temp., °C	Tempo, mês	Ag	As	Br	Co	Cr	Cs	Eu	Fe	La	Na, %	Rb	Sc	Se	Th	Zn
104	-20	2,0	2,36±0,21	17,2±4,5	206±9	0,845±0,059	1,09±0,18	0,106±0,019	0,0522±0,0060	603±49	0,73±0,06	1,92±0,09	4,50±0,61	0,191±0,012	4,43±0,33	0,263±0,027	118,2±7,3
150	20	0,5	2,33±0,16	17,8±4,6	219±27	0,852±0,029	1,24±0,15	0,109±0,011	0,0533±0,0075	617±37	0,78±0,10	1,99±0,11	4,46±0,69	0,187±0,006	4,35±0,18	0,260±0,025	117,4±10,4
123	20	1,0	2,32±0,12	14,2±2,8	199±19	0,855±0,042	1,26±0,12	0,108±0,013	0,0520±0,0064	606±28	0,69±0,08	1,82±0,14	4,64±0,49	0,188±0,013	4,56±0,10	0,250±0,017	116,2±5,4
81	20	1,5	2,36±0,13	14,7±2,1	218±21	0,878±0,052	1,17±0,19	0,109±0,012	0,0522±0,0042	597±31	0,70±0,17	2,03±0,19	4,74±0,82	0,193±0,010	4,59±0,32	0,262±0,027	116,4±2,2
13	20	2,0	2,37±0,15	16,8±2,4	205±31	0,839±0,112	1,17±0,11	0,103±0,015	0,0517±0,0039	586±24	0,77±0,18	1,86±0,52	4,29±0,65	0,191±0,011	4,47±0,29	0,277±0,069	112,9±8,4
166	40	0,5	2,34±0,25	16,9±4,1	218±16	0,849±0,030	1,13±0,17	0,108±0,017	0,0510±0,0043	598±58	0,73±0,03	1,95±0,15	4,53±0,45	0,189±0,006	4,43±0,24	0,251±0,011	115,3±11,1
111	40	1,0	2,44±0,29	16,6±5,4	216±27	0,877±0,056	1,18±0,12	0,109±0,011	0,0530±0,0038	613±10	0,70±0,17	1,97±0,39	4,76±0,36	0,195±0,015	4,42±0,19	0,271±0,019	119,9±1,5
51	40	1,5	2,36±0,09	14,2±1,8	208±17	0,826±0,008	1,14±0,07	0,112±0,006	0,0535±0,0044	586±41	0,74±0,04	1,91±0,24	4,73±0,51	0,188±0,007	4,29±0,34	0,254±0,022	114,4±9,4
7	40	2,0	2,23±0,10	16,4±3,9	209±25	0,817±0,018	1,07±0,14	0,106±0,015	0,0527±0,0040	602±18	0,72±0,09	1,92±0,18	4,27±0,39	0,182±0,011	4,14±0,15	0,240±0,022	115,3±8,0
170	60	0,5	2,41±0,36	14,5±1,3	198±4	0,866±0,053	1,16±0,26	0,110±0,016	0,0519±0,0064	607±21	0,68±0,13	1,88±0,10	4,65±0,74	0,195±0,012	4,40±0,22	0,267±0,027	119,7±8,1
86	60	1,0	2,32±0,30	15,9±5,0	219±19	0,860±0,038	1,18±0,17	0,112±0,006	0,0525±0,0045	599±39	0,71±0,14	1,94±0,11	4,65±0,55	0,188±0,018	4,45±0,14	0,251±0,027	115,4±7,4
65	60	1,5	2,41±0,05	17,1±5,7	216±33	0,879±0,077	1,17±0,13	0,110±0,008	0,0537±0,0064	608±14	0,76±0,20	1,95±0,26	4,91±0,60	0,197±0,010	4,54±0,40	0,270±0,021	117,0±3,7
15	60	2,0	2,34±0,27	15,6±4,3	218±15	0,862±0,091	1,23±0,17	0,104±0,010	0,0555±0,0034	599±18	0,75±0,13	2,03±0,25	4,54±0,47	0,198±0,027	4,30±0,28	0,265±0,057	117,6±4,2

^amédia e intervalo de confiança a 95 %

TABELA 4.6.4.2 Estatísticas da ANOVA para os valores médios de cada frasco, obtidos por INAA, para o estudo de estabilidade a curto prazo

Elemento	Fonte de variação	Média Quadrática	F	Valor de p	F_c^a
Ag	entre	0,0105	0,586	0,840	2,010
	dentro	0,0179			
As	entre	6,11	1,000	0,467	2,010
	dentro	6,11			
Br	entre	236	1,249	0,287	2,010
	dentro	189			
Co	entre	0,00151	1,128	0,366	2,010
	dentro	0,00134			
Cr	entre	0,0123	1,175	0,334	2,010
	dentro	0,0105			
Cs	entre	0,0000298	0,459	0,927	2,010
	dentro	0,0000649			
Eu	entre	0,0000066	0,620	0,812	2,010
	dentro	0,0000107			
Fe	entre	340	0,749	0,696	2,010
	dentro	454			
La	entre	0,00395	0,611	0,820	2,010
	dentro	0,00647			
Na	entre	0,0212	0,537	0,877	2,010
	dentro	0,0395			
Rb	entre	0,136	1,032	0,440	2,010
	dentro	0,132			
Sc	entre	0,0000787	1,120	0,373	2,010
	dentro	0,0000703			
Se	entre	0,0615	2,312	0,024	2,010
	dentro	0,0266			
Th	entre	0,000443	1,073	0,408	2,010
	dentro	0,000413			
Zn	entre	16,2	0,768	0,678	2,010
	dentro	21,1			

^a F_c para $\alpha = 0,05$; $\nu_1 = 12$ $\nu_2 = 39$

TABELA 4.6.4.3 Estatísticas da ANOVA para os valores médios dos frascos armazenados a 20°C em comparação com o frasco controle, obtidos por INAA, para o estudo de estabilidade a curto prazo

Elemento	Fonte de variação	Média Quadrática	F	Valor de p	F_c^a
Ag	entre	0,0015	0,149	0,961	3,056
	dentro	0,0101			
As	entre	10,24	2,173	0,122	3,056
	dentro	4,71			
Br	entre	300	1,452	0,266	3,056
	dentro	207			
Co	entre	0,00090	0,535	0,712	3,056
	dentro	0,00168			
Cr	entre	0,0212	1,974	0,150	3,056
	dentro	0,0107			
Cs	entre	0,0000261	0,326	0,856	3,056
	dentro	0,0000799			
Eu	entre	0,00000154	0,118	0,974	3,056
	dentro	0,0000131			
Fe	entre	552	1,154	0,370	3,056
	dentro	478			
La	entre	0,00654	1,028	0,425	3,056
	dentro	0,00636			
Na	entre	0,0467	0,667	0,625	3,056
	dentro	0,0700			
Rb	entre	0,120	0,699	0,604	3,056
	dentro	0,171			
Sc	entre	0,0000244	0,533	0,713	3,056
	dentro	0,0000457			
Se	entre	0,0370	1,391	0,284	3,056
	dentro	0,0266			
Th	entre	0,000375	0,671	0,622	3,056
	dentro	0,000558			
Zn	entre	16,5	0,790	0,550	3,056
	dentro	20,9			

^a F_c para $\alpha = 0,05$; $\nu_1 = 4$ $\nu_2 = 15$

TABELA 4.6.4.4 Estatísticas da ANOVA para os valores médios dos frascos armazenados a 40°C em comparação com o frasco controle, obtidos por INAA, para o estudo de estabilidade a curto prazo

Elemento	Fonte de variação	Média Quadrática	F	Valor de p	F_c^a
Ag	entre	0,0219	1,341	0,300	3,056
	dentro	0,0163			
As	entre	5,60	0,838	0,522	3,056
	dentro	6,68			
Br	entre	97	0,613	0,660	3,056
	dentro	158			
Co	entre	0,00216	3,460	0,034	3,056
	dentro	0,00063			
Cr	entre	0,00814	1,040	0,419	3,056
	dentro	0,00782			
Cs	entre	0,0000249	0,301	0,873	3,056
	dentro	0,0000830			
Eu	entre	0,00000716	0,837	0,522	3,056
	dentro	0,00000855			
Fe	entre	384	0,618	0,656	3,056
	dentro	621			
La	entre	0,00109	0,313	0,865	3,056
	dentro	0,00349			
Na	entre	0,0027	0,124	0,972	3,056
	dentro	0,0214			
Rb	entre	0,158	1,815	0,178	3,056
	dentro	0,087			
Sc	entre	0,0000843	1,880	0,166	3,056
	dentro	0,0000449			
Se	entre	0,0678	2,481	0,088	3,056
	dentro	0,0273			
Th	entre	0,000581	3,406	0,036	3,056
	dentro	0,000171			
Zn	entre	21,6	0,824	0,530	3,056
	dentro	26,2			

^a F_c para $\alpha = 0,05$; $\nu_1 = 4$ $\nu_2 = 15$

TABELA 4.6.4.5 Estatísticas da ANOVA para os valores médios dos frascos armazenados a 60°C em comparação com o frasco controle, obtidos por INAA, para o estudo de estabilidade a curto prazo

Elemento	Fonte de variação	Média Quadrática	F	Valor de p	F_c^a
Ag	entre	0,0065	0,241	0,911	3,056
	dentro	0,0270			
As	entre	5,08	0,656	0,631	3,056
	dentro	7,74			
Br	entre	341	2,444	0,092	3,056
	dentro	139			
Co	entre	0,00062	0,360	0,833	3,056
	dentro	0,00173			
Cr	entre	0,0100	0,729	0,586	3,056
	dentro	0,0137			
Cs	entre	0,0000366	0,569	0,689	3,056
	dentro	0,0000644			
Eu	entre	0,00000909	0,765	0,564	3,056
	dentro	0,0000119			
Fe	entre	66	0,144	0,963	3,056
	dentro	458			
La	entre	0,00393	0,520	0,722	3,056
	dentro	0,00755			
Na	entre	0,0118	0,945	0,465	3,056
	dentro	0,0125			
Rb	entre	0,104	0,728	0,587	3,056
	dentro	0,143			
SC	entre	0,0000669	0,579	0,682	3,056
	dentro	0,000116			
Se	entre	0,0307	0,930	0,473	3,056
	dentro	0,0330			
Th	entre	0,000218	0,477	0,752	3,056
	dentro	0,000457			
Zn	entre	10,2	0,627	0,651	3,056
	dentro	16,2			

^a F_c para $\alpha = 0,05$; $\nu_1 = 4$ $\nu_2 = 15$

FIGURA 4.6.4.1 Investigação de tendência no estudo de estabilidade a curto prazo para elementos seleccionados por INAA, com resultados apresentados por ordem de tempo e ajuste de curva linear

Para complementar o estudo de estabilidade, os resultados médios obtidos nas diversas temperaturas, para cada elemento, foram normalizados aos resultados obtidos para o frasco controle, armazenado na temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, obtendo-se a razão Q_T , de acordo com a Equação 4.10.

$$Q_T = \frac{w_T}{w_{-20^{\circ}\text{C}}} \quad (4.10)$$

onde w_T é a concentração do elemento, na temperatura T .

No caso de estabilidade, a razão Q_T deve ser igual a 1, considerando-se a incerteza de medição combinada, u_T , que pode ser estimada das concentrações w_T , e respectivos desvios padrão, s_T , obtidos para cada temperatura, conforme descrito na Equação 4.11 (IAEA, 2003; AZEMARD e col., 2006).

$$u_T = \sqrt{\left(\frac{s_T}{w_T}\right)^2 + \left(\frac{s_{-20^\circ\text{C}}}{w_{-20^\circ\text{C}}}\right)^2} Q_T \quad (4.11)$$

Como observado na TAB 4.6.4.6, exceto para As (60°C e 0,5 mês de exposição) e Cr (20°C e 1 mês de exposição), as razões Q_T obtidas ficaram dentro do intervalo $Q_T - u_T$ e $Q_T + u_T$. Assim, concluiu-se que nenhuma instabilidade pôde ser observada para as condições testadas. As variações para As e Cr parecem estar mais relacionadas à imprecisão do método do que a qualquer degradação do material.

Como ilustração, na FIG 4.6.4.2 são apresentadas as razões Q_T para elementos selecionados. Nessa figura, incertezas foram suprimidas por motivo de clareza. Os resultados obtidos para Ag e Fe representam o padrão para a maioria dos elementos, estando os demais resultados apresentados no Apêndice H1.

Ainda que o Se não tenha passado no teste de ANOVA no nível de confiança de 95 %, nenhuma degradação é observada do gráfico. A representação gráfica do As mostra que esse elemento é o mais adverso, no que se refere à estabilidade a curto prazo. Ainda que o As possa ser instável em materiais de referência, devido à degradação ou perda de espécies orgânicas por volatilização (GREENBERG, 2005), a observação do padrão do gráfico, em particular para o frasco que foi mantido a 60°C, levou à conclusão de que as variações observadas são relacionadas à precisão insuficiente do método e não a qualquer degradação durante o período do teste.

Concluiu-se do teste de estabilidade a curto prazo que o candidato a MR de mexilhão é estável o suficiente para ser transportando sob condições normais de transporte, sem alterações significativas na composição dos elementos determinados no estudo.

TABELA 4.6.4.6 Resultados normalizados, Q_T , obtidos por INAA, para o estudo de estabilidade a curto prazo

Elemento	Temperatura, °C	$Q_T \pm u_T^a$			
		0,5 mês	1,0 mês	1,5 mês	2,0 meses
Ag	20	$0,991 \pm 0,070$	$0,985 \pm 0,064$	$1,002 \pm 0,061$	$1,004 \pm 0,070$
	40	$0,991 \pm 0,087$	$1,034 \pm 0,095$	$0,999 \pm 0,061$	$0,946 \pm 0,059$
	60	$1,024 \pm 0,111$	$0,986 \pm 0,098$	$1,021 \pm 0,058$	$0,992 \pm 0,092$
As	20	$1,03 \pm 0,24$	$0,82 \pm 0,17$	$0,85 \pm 0,16$	$0,97 \pm 0,18$
	40	$0,98 \pm 0,22$	$0,96 \pm 0,25$	$0,83 \pm 0,15$	$0,95 \pm 0,21$
	60	$0,84 \pm 0,15$	$0,92 \pm 0,24$	$0,99 \pm 0,26$	$0,90 \pm 0,22$
Br	20	$1,059 \pm 0,087$	$0,964 \pm 0,065$	$1,057 \pm 0,071$	$0,992 \pm 0,099$
	40	$1,053 \pm 0,058$	$1,045 \pm 0,087$	$1,009 \pm 0,059$	$1,011 \pm 0,082$
	60	$0,958 \pm 0,028$	$1,060 \pm 0,065$	$1,048 \pm 0,104$	$1,058 \pm 0,054$
Co	20	$1,009 \pm 0,050$	$1,013 \pm 0,055$	$1,040 \pm 0,060$	$0,993 \pm 0,094$
	40	$1,005 \pm 0,050$	$1,038 \pm 0,062$	$0,978 \pm 0,044$	$0,967 \pm 0,045$
	60	$1,025 \pm 0,060$	$1,019 \pm 0,053$	$1,041 \pm 0,073$	$1,021 \pm 0,081$
Cr	20	$1,14 \pm 0,15$	$1,16 \pm 0,14$	$1,07 \pm 0,16$	$1,07 \pm 0,13$
	40	$1,04 \pm 0,15$	$1,09 \pm 0,13$	$1,05 \pm 0,12$	$0,98 \pm 0,13$
	60	$1,06 \pm 0,19$	$1,08 \pm 0,15$	$1,07 \pm 0,13$	$1,13 \pm 0,15$
Cs	20	$1,02 \pm 0,13$	$1,01 \pm 0,14$	$1,03 \pm 0,14$	$0,97 \pm 0,14$
	40	$1,02 \pm 0,15$	$1,03 \pm 0,13$	$1,05 \pm 0,13$	$1,00 \pm 0,14$
	60	$1,03 \pm 0,15$	$1,05 \pm 0,12$	$1,03 \pm 0,13$	$0,98 \pm 0,13$
Eu	20	$1,023 \pm 0,117$	$0,998 \pm 0,106$	$1,002 \pm 0,089$	$0,991 \pm 0,086$
	40	$0,979 \pm 0,088$	$1,017 \pm 0,087$	$1,025 \pm 0,091$	$1,011 \pm 0,088$
	60	$0,995 \pm 0,106$	$1,006 \pm 0,091$	$1,030 \pm 0,108$	$1,065 \pm 0,088$
Fe	20	$1,024 \pm 0,065$	$1,006 \pm 0,059$	$0,989 \pm 0,060$	$0,971 \pm 0,055$
	40	$0,991 \pm 0,079$	$1,017 \pm 0,053$	$0,974 \pm 0,065$	$0,998 \pm 0,054$
	60	$1,007 \pm 0,056$	$0,994 \pm 0,065$	$1,008 \pm 0,062$	$0,994 \pm 0,054$
La	20	$1,07 \pm 0,10$	$0,95 \pm 0,09$	$0,95 \pm 0,15$	$1,05 \pm 0,17$
	40	$1,00 \pm 0,06$	$0,96 \pm 0,15$	$1,01 \pm 0,07$	$0,98 \pm 0,10$
	60	$0,93 \pm 0,12$	$0,97 \pm 0,13$	$1,04 \pm 0,18$	$1,02 \pm 0,13$
Na	20	$1,035 \pm 0,046$	$0,948 \pm 0,053$	$1,057 \pm 0,067$	$0,965 \pm 0,171$
	40	$1,014 \pm 0,056$	$1,026 \pm 0,129$	$0,992 \pm 0,084$	$1,000 \pm 0,065$
	60	$0,976 \pm 0,041$	$1,009 \pm 0,046$	$1,016 \pm 0,090$	$1,054 \pm 0,085$
Rb	20	$0,99 \pm 0,13$	$1,03 \pm 0,11$	$1,05 \pm 0,14$	$0,95 \pm 0,12$
	40	$1,01 \pm 0,11$	$1,06 \pm 0,10$	$1,05 \pm 0,11$	$0,95 \pm 0,10$
	60	$1,03 \pm 0,14$	$1,03 \pm 0,12$	$1,09 \pm 0,12$	$1,01 \pm 0,11$
Sc	20	$0,982 \pm 0,044$	$0,984 \pm 0,059$	$1,010 \pm 0,053$	$1,003 \pm 0,054$
	40	$0,989 \pm 0,044$	$1,022 \pm 0,064$	$0,986 \pm 0,046$	$0,956 \pm 0,052$
	60	$1,022 \pm 0,058$	$0,986 \pm 0,070$	$1,033 \pm 0,054$	$1,036 \pm 0,099$
Se	20	$0,983 \pm 0,053$	$1,029 \pm 0,051$	$1,036 \pm 0,067$	$1,009 \pm 0,063$
	40	$1,001 \pm 0,059$	$0,997 \pm 0,055$	$0,967 \pm 0,067$	$0,934 \pm 0,049$
	60	$0,993 \pm 0,057$	$1,004 \pm 0,052$	$1,025 \pm 0,075$	$0,970 \pm 0,061$
Th	20	$0,990 \pm 0,087$	$0,952 \pm 0,072$	$0,995 \pm 0,090$	$1,055 \pm 0,178$
	40	$0,955 \pm 0,066$	$1,032 \pm 0,079$	$0,967 \pm 0,081$	$0,911 \pm 0,079$
	60	$1,017 \pm 0,090$	$0,955 \pm 0,088$	$1,027 \pm 0,082$	$1,009 \pm 0,150$
Zn	20	$0,993 \pm 0,067$	$0,983 \pm 0,048$	$0,985 \pm 0,040$	$0,955 \pm 0,058$
	40	$0,975 \pm 0,070$	$1,014 \pm 0,040$	$0,967 \pm 0,062$	$0,976 \pm 0,057$
	60	$1,013 \pm 0,058$	$0,976 \pm 0,055$	$0,990 \pm 0,043$	$0,995 \pm 0,044$

^a Q_T e u_T calculados de acordo com as Equações 4.10 e 4.11, respectivamente

FIGURA 4.6.4.2 Razões Q_T para o estudo de estabilidade a curto prazo por INAA para elementos selecionados

4.6.4.2 Estudo por AAS

São apresentadas na TAB 4.6.4.7 as concentrações em base úmida, obtidas por AAS, para o estudo de estabilidade a curto prazo.

Foi realizado teste de ANOVA para a concentração média das quatro sub-amostras de cada frasco, cujos resultados estão apresentados na TAB 4.6.4.8. Foi observado que, no nível de confiança de 95 %, não há diferenças significativas entre as concentrações médias obtidas para os frascos, independentemente da temperatura e do tempo de exposição a esta.

Nas TAB 4.6.4.9, 4.6.4.10 e 4.6.4.11, o teste de ANOVA para igualdade de médias foi realizado separadamente para os frascos mantidos a 20, 40 e 60 °C, respectivamente. Como resultado, foi observada igualdade de médias para os elementos Hg e Cd em todas as temperaturas e Pb na temperatura de 60 °C. Nas demais temperaturas, o teste mostrou que há diferenças entre médias dos resultados obtidos para Pb, uma vez que F calculado foi maior que F crítico para essas temperaturas.

TABELA 4.6.4.7 Concentrações de elementos, em $\mu\text{g kg}^{-1}$, obtidas por AAS, para o estudo de estabilidade a curto prazo (base úmida)^a

Frasco	Temp., °C	Tempo, mês	Hg	Cd	Pb
104	-20	2,0	214 ± 50	540 ± 41	625 ± 50
150	20	0,5	214 ± 72	533 ± 39	562 ± 95
123	20	1,0	200 ± 49	545 ± 31	526 ± 46
81	20	1,5	232 ± 14	534 ± 28	562 ± 23
13	20	2,0	210 ± 17	546 ± 31	554 ± 72
166	40	0,5	184 ± 39	549 ± 43	551 ± 79
111	40	1,0	230 ± 50	538 ± 49	527 ± 58
51	40	1,5	222 ± 30	508 ± 17	501 ± 64
7	40	2,0	203 ± 45	545 ± 40	539 ± 41
170	60	0,5	225 ± 27	541 ± 55	527 ± 47
86	60	1,0	201 ± 47	543 ± 42	552 ± 73
65	60	1,5	207 ± 55	538 ± 32	542 ± 130
15	60	2,0	213 ± 57	527 ± 41	526 ± 56

^amédia e intervalo de confiança a 95 %

TABELA 4.6.4.8 Estatísticas da ANOVA para os valores médios de cada frasco, obtidos por AAS, para o estudo de estabilidade a curto prazo

Elemento	Fonte de variação	Média quadrática	<i>F</i>	Valor de <i>p</i>	<i>F_c</i> ^a
Hg	entre	735	0,900	0,555	2,010
	dentro	817			
Cd	entre	470	0,797	0,651	2,010
	dentro	590			
Pb	entre	3454	1,825	0,078	2,010
	dentro	1893			

^a*F_c* para $\alpha = 0,05$; $\nu_1 = 12$ $\nu_2 = 39$

TABELA 4.6.4.9 Estatísticas da ANOVA para os valores médios dos frascos armazenados a 20°C em comparação com o frasco controle, obtidos por AAS, para o estudo de estabilidade a curto prazo

Elemento	Fonte de variação	Média quadrática	F	Valor de p	F_c^a
Hg	entre	546	0,648	0,637	3,056
	dentro	842			
Cd	entre	136	0,292	0,878	3,056
	dentro	464			
Pb	entre	5174	3,397	0,036	3,056
	dentro	1524			

^a F_c para $\alpha = 0,05$; $v_1 = 4$ $v_2 = 15$

TABELA 4.6.4.10 Estatísticas da ANOVA para os valores médios dos frascos armazenados a 40°C em comparação com o frasco controle, obtidos por AAS, para o estudo de estabilidade a curto prazo

Elemento	Fonte de variação	Média Quadrática	F	Valor de p	F_c^a
Hg	entre	1316	1,761	0,189	3,056
	dentro	747			
Cd	entre	1082	1,773	0,187	3,056
	dentro	610			
Pb	entre	8576	6,059	0,004	3,056
	dentro	1415			

^a F_c para $\alpha = 0,05$; $v_1 = 4$ $v_2 = 15$

TABELA 4.6.4.11 Estatísticas da ANOVA para os valores médios dos frascos armazenados a 60°C em comparação com o frasco controle, obtidos por AAS, para o estudo de estabilidade a curto prazo

Elemento	Fonte de variação	Média Quadrática	F	Valor de p	F_c^a
Hg	entre	321	0,344	0,844	3,056
	dentro	931			
Cd	entre	168	0,233	0,916	3,056
	dentro	724			
Pb	entre	6608	2,772	0,066	3,056
	dentro	2383			

^a F_c para $\alpha = 0,05$; $v_1 = 4$ $v_2 = 15$

Os resultados obtidos para o teste de ANOVA são concordantes com a observação da FIGURA 4.6.4.3. Observou-se que as concentrações obtidas para Hg e Cd apresentaram distribuição semelhante ao longo do tempo, enquanto que os resultados para Pb, apesar de apresentarem distribuição semelhante, ficaram, na média, abaixo dos valores obtidos para o frasco controle, o que levou a estatística do teste, F , ser maior que o respectivo F crítico.

Ainda que isso possa indicar perda desse elemento, com o armazenamento dos frascos a temperaturas mais altas, como a concentração de chumbo se manteve constante ao longo do tempo, o mais provável é que não tenha ocorrido degradação do elemento. É possível que o observado esteja relacionado à incerteza dos valores de concentração obtidos.

Para complementar o estudo, os resultados médios obtidos nas diversas temperaturas, para cada elemento, foram normalizados aos resultados obtidos para o frasco controle, armazenado na temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, obtendo-se as razões Q_T , apresentadas na TAB 4.6.4.12.

Foi observado que as razões Q_T obtidas ficaram dentro do intervalo $Q_T - u_T$ e $Q_T + u_T$ para Hg e Cd, com exceção do resultado obtido para Cd para $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 1,5 meses de exposição. Assim, concluiu-se, juntamente com a observação da FIG 4.6.4.4, que nenhuma instabilidade pôde ser observada para as condições testadas para esses elementos.

No caso do Pb, uma vez que as concentrações obtidas para o frasco controle foram mais altas do que as observadas para os frascos armazenados nas diversas temperaturas, as razões Q_T obtidas ficaram dentro do intervalo $Q_T - u_T$ e $Q_T + u_T$ apenas para a temperatura de $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 0,5 mês de exposição e para a temperatura de $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 1,5 meses de exposição. Mais uma vez, a observação gráfica (FIG 4.6.4.4) levou à conclusão de que o observado provavelmente não está relacionado à degradação da concentração do elemento nas amostras.

FIGURA 4.6.4.3 Investigação de tendência no estudo de estabilidade a curto prazo de Hg, Cd e Pb por AAS, com resultados apresentados por ordem de tempo e ajuste de curva linear

TABELA 4.6.4.12 Resultados normalizados, Q_T , obtidos por AAS, para o estudo de estabilidade a curto prazo

Elemento	Temperatura, °C	$Q_T \pm u_T^a$			
		0,5 mês	1,0 mês	1,5 mês	2,0 meses
Hg	20	$1,00 \pm 0,26$	$0,94 \pm 0,20$	$1,09 \pm 0,17$	$0,98 \pm 0,15$
	40	$0,86 \pm 0,17$	$1,08 \pm 0,22$	$1,04 \pm 0,18$	$0,95 \pm 0,19$
	60	$1,06 \pm 0,17$	$0,94 \pm 0,20$	$0,97 \pm 0,22$	$1,00 \pm 0,22$
Cd	20	$0,988 \pm 0,065$	$1,009 \pm 0,060$	$0,990 \pm 0,058$	$1,011 \pm 0,060$
	40	$1,017 \pm 0,069$	$0,996 \pm 0,074$	$0,940 \pm 0,049$	$1,010 \pm 0,067$
	60	$1,002 \pm 0,080$	$1,006 \pm 0,069$	$0,996 \pm 0,060$	$0,975 \pm 0,067$
Pb	20	$0,900 \pm 0,106$	$0,843 \pm 0,063$	$0,900 \pm 0,051$	$0,887 \pm 0,085$
	40	$0,883 \pm 0,092$	$0,843 \pm 0,072$	$0,803 \pm 0,076$	$0,862 \pm 0,060$
	60	$0,844 \pm 0,064$	$0,884 \pm 0,086$	$0,867 \pm 0,139$	$0,843 \pm 0,070$

^a Q_T e u_T calculados de acordo com as Equações 4.10 e 4.11, respectivamente

FIGURA 4.6.4.4 Razões Q_T para o estudo de estabilidade a curto prazo por AAS

Do exposto acima, concluiu-se do teste de estabilidade a curto prazo por AAS para Hg, Cd e Pb, que o candidato a MR de mexilhão é estável o suficiente para ser transportando sob condições normais de transporte, sem alterações significativas na composição desses elementos.

4.6.5 Estudo de estabilidade a longo prazo

4.6.5.1 Estudo por INAA

São apresentadas na TAB 4.6.5.1 as concentrações em base úmida, obtidas por INAA, para o estudo de estabilidade a longo prazo (MOREIRA e col., 2010b).

TABELA 4.6.5.1 Concentração de elementos, em mg kg^{-1} , obtidas por INAA, para o estudo de estabilidade a longo prazo (base úmida)^a

Tempo	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses	10 meses	12 meses	12 meses
Temp.	20 °C	20 °C	20 °C	20 °C	20 °C	20 °C	-20 °C
Frasco	62	14	128	42	99	147	115
Ag	2,36 ± 0,25	2,3 1 ± 0,10	2,23 ± 0,29	2,25 ± 0,07	2,25 ± 0,21	2,34 ± 0,24	2,21 ± 0,23
As	13,76 ± 0,76	13,50 ± 0,92	14,19 ± 1,27	14,51 ± 0,88	13,63 ± 0,87	13,66 ± 1,17	13,88 ± 1,27
Br	207 ± 38	212 ± 17	205 ± 33	211 ± 19	214 ± 17	222 ± 20	199 ± 33
Co	0,858 ± 0,049	0,849 ± 0,063	0,833 ± 0,055	0,839 ± 0,054	0,830 ± 0,015	0,837 ± 0,046	0,837 ± 0,058
Cr	1,06 ± 0,10	1,06 ± 0,20	1,25 ± 0,04	1,11 ± 0,11	1,04 ± 0,20	1,20 ± 0,05	1,15 ± 0,15
Cs	0,119 ± 0,017	0,114 ± 0,022	0,107 ± 0,014	0,107 ± 0,019	0,101 ± 0,010	0,116 ± 0,009	0,101 ± 0,012
Eu	0,0551 ± 0,0039	0,0505 ± 0,0036	0,0529 ± 0,0075	0,0520 ± 0,0050	0,0535 ± 0,0050	0,0530 ± 0,0026	0,0516 ± 0,0041
Fe	591 ± 25	595 ± 25	608 ± 29	604 ± 18	590 ± 48	604 ± 42	600 ± 29
La	0,695 ± 0,062	0,684 ± 0,065	0,710 ± 0,142	0,742 ± 0,071	0,666 ± 0,048	0,722 ± 0,092	0,719 ± 0,042
Na, %	1,80 ± 0,24	1,80 ± 0,06	1,94 ± 0,32	2,00 ± 0,23	1,96 ± 0,04	1,93 ± 0,27	1,86 ± 0,30
Rb	4,63 ± 0,23	4,64 ± 0,30	4,84 ± 0,83	4,26 ± 0,65	4,62 ± 0,70	4,70 ± 0,48	4,53 ± 0,79
Sc	0,192 ± 0,020	0,188 ± 0,009	0,183 ± 0,014	0,182 ± 0,006	0,185 ± 0,020	0,194 ± 0,017	0,185 ± 0,016
Se	4,42 ± 0,32	4,53 ± 0,33	4,42 ± 0,06	4,43 ± 0,30	4,44 ± 0,24	4,52 ± 0,18	4,42 ± 0,38
Th	0,264 ± 0,035	0,250 ± 0,013	0,261 ± 0,037	0,247 ± 0,022	0,252 ± 0,030	0,257 ± 0,026	0,257 ± 0,019
Zn	114,5 ± 4,1	115,6 ± 7,6	114,5 ± 4,5	115,5 ± 4,8	112,2 ± 6,1	115,3 ± 7,6	113,2 ± 5,7

^amédia e intervalo de confiança a 95 %

Da FIG 4.6.5.1, pôde-se concluir para o elemento Se que não foi observada tendência, nem por ordem de medição, nem por tempo de exposição. Resultados semelhantes foram obtidos para os demais elementos, conforme apresentado no Apêndice II.

FIGURA 4.6.5.1 Investigação de tendência no estudo de estabilidade a longo prazo do Se por INAA: a) resultados apresentados por ordem de medição com ajuste de curva linear; b) resultados apresentados por ordem de tempo com ajuste de curva linear

Os resultados do teste de ANOVA para a regressão linear, apresentados na TAB 4.6.5.2, mostraram que para os elementos analisados por INAA, com exceção do Br por ordem de medição e Cr por ordem de frasco, F calculado foi menor que F crítico, e o valor de p , maior que 0,05, e, portanto, não foi verificada tendência, nem durante o processo de medição, nem em função da ordem do tempo de exposição, o que confirma as conclusões obtidas a partir dos gráficos de regressão linear.

TABELA 4.6.5.2 Estatísticas da ANOVA da regressão linear para o estudo de estabilidade a longo prazo, para os resultados obtidos por INAA

Elemento	Ordem de medição		Ordem de frasco		Ordem de tempo	
	F	valor de p	F	valor de p	F	valor de p
As	0,397	0,534	0,001	0,976	0,010	0,923
Ag	0,419	0,523	0,484	0,493	0,016	0,900
Br	8,821	0,006	0,032	0,859	4,053	0,055
Co	0,799	0,380	1,100	0,304	1,373	0,252
Cr	0,146	0,705	4,668	0,040	0,663	0,423
Cs	0,419	0,523	0,504	0,484	0,159	0,693
Eu	0,450	0,508	0,998	0,327	0,003	0,956
Fe	0,731	0,400	0,531	0,473	0,040	0,842
La	0,975	0,333	0,187	0,669	0,035	0,853
Na	2,777	0,108	0,756	0,393	3,814	0,062
Rb	1,678	0,207	1,742	0,198	0,198	0,660
Sc	1,547	0,225	0,413	0,526	0,074	0,788
Se	0,056	0,815	0,357	0,555	0,009	0,923
Th	0,039	0,844	0,467	0,501	0,902	0,351
Zn	0,894	0,353	0,608	0,443	0,037	0,849

^a $F_c = 4,225$ para $\alpha = 0,05$; $v_1 = 1$, $v_2 = 26$

Na TAB 4.6.5.3 são apresentados os resultados do teste de ANOVA para a igualdade das médias de concentração das quatro sub-amostras para os sete frascos utilizados para cada elemento. Como tendência geral, foi observado que a variabilidade dentro dos frascos é da mesma ordem de magnitude da variabilidade entre os frascos. Isto é uma indicação de que não foram observadas diferenças significativas entre os frascos, mas sim as resultantes da precisão do método de INAA utilizado. Exceto para Cr, F calculado foi menor que F crítico no nível de confiança de 95 %, indicando que não houve diferenças significativas entre as concentrações médias obtidas para os frascos. No caso do Cr, ao se considerar o nível de confiança de 99 %, F calculado foi menor que F crítico ($F_c = 3,811$), indicando que neste nível mais restrito, as médias dos resultados dos frascos podem ser consideradas iguais. Essas informações são corroboradas pelos valores de p obtidos, que, com exceção do Cr, foram todos maiores que o nível de significância $\alpha = 0,05$.

Na TAB 4.6.5.4 são apresentados os resultados normalizados para o estudo de estabilidade a longo prazo. As razões Q_T obtidas ficaram dentro dos intervalos $Q_T - u_T$ e $Q_T + u_T$ para todos os elementos e, portanto, pode-se concluir que nenhuma instabilidade foi observada. Como ilustração, na FIG 4.6.5.2 apresentam-se os valores Q_T para elementos selecionados. Ainda que o Cr não tenha sido aprovado no teste de ANOVA a 95 % de confiança, nenhuma degradação foi observada a partir do gráfico para o Cr na FIG 4.6.5.2. Os gráficos para os demais elementos estão apresentados no Apêndice H2. Chega-se à mesma conclusão para o gráfico do Cs, que mesmo tendo sido aprovado no teste de ANOVA para igualdade de médias, apresentou valor de F próximo ao valor crítico F_c . As variações observadas para este elemento parecem estar relacionadas à precisão da técnica e não a qualquer degradação do material no período estudado.

TABELA 4.6.5.3 Resultados de ANOVA para o teste de estabilidade a longo prazo, obtidos por INAA

Elemento	Fonte de variação	Média Quadrática	F	Valor de p	F_c^a
Ag	entre	0,0134	0,747	0,619	2,573
	dentro	0,0180			
As	entre	0,507	1,196	0,346	2,573
	dentro	0,424			
Br	entre	223	0,791	0,587	2,573
	dentro	282			
Co	entre	0,00038	0,376	0,886	2,573
	dentro	0,00102			
Cr	entre	0,0246	3,422	0,016	2,573
	dentro	0,0072			
Cs	entre	0,000212	2,293	0,074	2,573
	dentro	0,000092			
Eu	entre	0,00000874	1,081	0,405	2,573
	dentro	0,00000809			
Fe	entre	186	0,451	0,836	2,573
	dentro	413			
La	entre	0,00261	1,009	0,446	2,573
	dentro	0,00259			
Na	entre	0,0244	1,119	0,385	2,573
	dentro	0,0218			
Rb	entre	0,129	0,883	0,524	2,573
	dentro	0,146			
Sc	entre	0,0000734	0,784	0,592	2,573
	dentro	0,0000936			
Se	entre	0,0086	0,286	0,937	2,573
	dentro	0,0301			
Th	entre	0,000145	0,496	0,804	2,573
	dentro	0,000292			
Zn	entre	6,43	0,467	0,825	2,573
	dentro	13,78			

^a F_c para $\alpha = 0,05$; $v_1 = 6$, $v_2 = 21$

TABELA 4.6.5.4 Resultados normalizados para o estudo de estabilidade a longo prazo, obtidos por INAA

Elemento	$Q_T \pm u_T$					
	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses	10 meses	12 meses
Ag	1,068±0,099	1,045±0,074	1,011±0,093	1,018±0,070	1,021±0,090	1,062±0,098
As	0,991±0,066	0,973±0,070	1,022±0,081	1,045±0,072	0,982±0,069	0,984±0,078
Br	1,04±0,16	1,07±0,12	1,03±0,15	1,06±0,13	1,08±0,13	1,12±0,13
Co	1,025±0,058	1,014±0,065	0,995±0,062	1,002±0,060	0,992±0,045	1,000±0,056
Cr	0,93±0,09	0,92±0,13	1,09±0,12	0,97±0,10	0,91±0,13	1,05±0,09
Cs	1,18±0,14	1,13±0,16	1,06±0,10	1,06±0,14	1,00±0,10	1,15±0,10
Eu	1,067±0,071	0,978±0,066	1,025±0,071	1,008±0,063	1,037±0,080	1,027±0,061
Fe	0,986±0,040	0,991±0,040	1,013±0,043	1,007±0,036	0,984±0,059	1,006±0,054
La	0,966±0,065	0,950±0,067	0,987±0,052	1,031±0,073	0,926±0,054	1,004±0,089
Na	0,97±0,13	0,97±0,10	1,04±0,15	1,08±0,14	1,05±0,11	1,04±0,14
Rb	1,02±0,12	1,02±0,12	1,07±0,15	0,94±0,14	1,02±0,15	1,04±0,13
Sc	1,039±0,088	1,018±0,062	1,017±0,075	0,982±0,055	1,002±0,086	1,048±0,081
Se	0,999±0,070	1,023±0,073	0,999±0,077	1,001±0,069	1,004±0,064	1,021±0,061
Th	1,028±0,098	0,971±0,055	1,015±0,065	0,962±0,070	0,981±0,085	0,999±0,078
Zn	1,012±0,039	1,021±0,053	1,012±0,044	1,021±0,042	0,992±0,046	1,018±0,053

FIGURA 4.6.5.2. Razões $Q_T \pm u_T$ para o estudo de estabilidade a longo prazo por INAA para elementos selecionados

Com a aplicação do método de INAA ao estudo de estabilidade a longo prazo, foi possível confirmar que não houve mudanças significativas na concentração dos quinze elementos estudados durante o período do teste. Conclui-se, então, que o candidato a material de referência de mexilhão é suficientemente estável para ser armazenado à temperatura ambiente, sem alterações significativas na composição dos elementos estudados.

4.6.5.2 Estudo por AAS

São apresentadas na TAB 4.6.5.5 as concentrações em base úmida, obtidas por AAS, para o estudo de estabilidade a longo prazo.

TABELA 4.6.5.5 Concentração de elementos, em $\mu\text{g kg}^{-1}$, obtidas por AAS, para o estudo de estabilidade a longo prazo (base úmida)^a

Tempo	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses	10 meses	12 meses	12 meses
Temp.	20 °C	20 °C	20 °C	20 °C	20 °C	20 °C	-20 °C
Frasco	62	14	128	42	99	147	115
Hg	203 ± 17	219 ± 26	225 ± 36	202 ± 12	208 ± 7	203 ± 22	197 ± 20
Cd	539 ± 21	546 ± 21	543 ± 23	548 ± 16	550 ± 7	546 ± 6	540 ± 10
Pb	505±74	479±38	486±68	523±36	473±54	467±30	469 ± 46

^amédia e intervalo de confiança a 95 %

Não foi observada tendência na FIG 4.6.5.3, nem por ordem de medição, nem por tempo de exposição para o elemento Hg durante todo o período do estudo de estabilidade a longo prazo. Os resultados para Cd e Pb estão apresentados no Apêndice I2.

FIGURA 4.6.5.3 Investigação de tendência no estudo de estabilidade a longo prazo do Hg por AAS: a) resultados apresentados por ordem de medição com ajuste de curva linear; b) resultados apresentados por ordem de tempo com ajuste de curva linear

Os resultados do teste de ANOVA para a regressão linear, apresentados na TAB 4.6.5.6, mostraram que F calculado foi menor que F crítico e o valor de p , maior que 0,05, para os três elementos, ao se ordenar os resultados por ordem de frasco e por ordem de tempo de exposição, indicando que não se observaram tendências. Porém, para Cd e Pb, F calculado foi maior que F crítico ao se considerar os resultados por ordem de medição. Pode-se também observar a tendência a partir dos gráficos do Apêndice I2, no qual se observa que os coeficientes de determinação para Cd e Pb foram $R^2 = 0,1771$ e $R^2 = 0,4926$, respectivamente. Isso se relaciona à diminuição da concentração desses elementos que foi observada durante a campanha de medição por ET AAS, fato que merece investigação mais aprofundada de forma a evitá-la. Ainda que esta condição de trabalho não tenha sido a ideal, considerou-se que não inviabilizou o estudo de estabilidade desses elementos.

TABELA 4.6.5.6 Estatísticas da ANOVA da regressão linear para o estudo de estabilidade a longo prazo, para os resultados obtidos por AAS^a

Elemento	Ordem de medição		Ordem de frasco		Ordem de tempo	
	<i>F</i>	valor de <i>p</i>	<i>F</i>	valor de <i>p</i>	<i>F</i>	valor de <i>p</i>
Hg	2,357	0,137	0,121	0,730	0,059	0,810
Cd	5,596	0,026	0,464	0,502	1,3364	0,258
Pb	25,240	0,0000316	2,909	0,100	0,075	0,787

^a $F_c = 4,225$ para $\alpha = 0,05$; $v_1 = 1$, $v_2 = 26$

Na TAB 4.6.5.7 são apresentados os resultados do teste de ANOVA para a concentração das quatro sub-amostras para os sete frascos utilizados para cada elemento. Foi observado que F foi menor que F_c no nível de confiança de 95 %, e valores de p obtidos, foram maiores que o nível de significância $\alpha = 0,05$, indicando que não houve diferenças significativas entre as concentrações médias obtidas para os frascos, e portanto, a concentração dos elementos se manteve estável durante o estudo.

TABELA 4.6.5.7 Resultados de ANOVA para o teste de estabilidade a longo prazo, obtidos por AAS

Elemento	Fonte de variação	Média Quadrática	<i>F</i>	Valor de <i>p</i>	F_c^a
Hg	entre	394	2,088	0,098	2,573
	dentro	189			
Cd	entre	69,3	0,677	0,677	2,573
	dentro	103,8			
Pb	entre	1729	1,639	0,186	2,573
	dentro	1055			

^a F_c para $\alpha = 0,05$; $v_1 = 6$, $v_2 = 21$

Na TAB 4.6.5.8 são apresentados os resultados normalizados para o estudo de estabilidade a longo prazo por AAS. As razões Q_T obtidas ficaram dentro dos intervalos $Q_T - u_T$ e $Q_T + u_T$ para os três elementos e, portanto, pode-se concluir que nenhuma instabilidade foi observada. Para Hg, 6 meses, Cd, 10 meses e PB, 8 meses, os valores obtidos ultrapassaram levemente o intervalo previsto para a conclusão de estabilidade. No

entanto, como mostrado na FIG 4.6.5.2, pode-se observar que as concentrações dos três elementos se mantiveram constantes durante o período do estudo.

TABELA 4.6.5.8 Resultados normalizados para o estudo de estabilidade a longo prazo, obtidos por AAS

Elemento	$Q_T \pm u_T$					
	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses	10 meses	12 meses
Hg	1,031±0,084	1,108±0,109	1,140±0,136	1,025±0,074	1,056±0,070	1,028±0,097
Cd	0,998±0,027	1,011±0,027	1,005±0,029	1,015±0,022	1,019±0,015	1,003±0,014
Pb	1,077±0,119	1,021±0,081	1,036±0,111	1,115±0,083	1,010±0,095	0,995±0,073

FIGURA 4.6.5.4 Razões $Q_T \pm u_T$ para o estudo de estabilidade a longo prazo por AAS

Verificou-se, com a aplicação dos métodos de AAS ao estudo de estabilidade a longo prazo, que não houve mudanças significativas na concentração de Hg, Cd e Pb, durante o período de ensaio. Conclui-se, então, que o candidato a material de referência de

mexilhão é suficientemente estável para ser armazenado à temperatura ambiente, sem alterações significativas na composição dos elementos estudados.

A partir dos resultados do estudo de estabilidade a longo prazo por INAA e AAS, definiu-se o tempo de prateleira de dois anos para o candidato a MR de mexilhão. Esse valor foi definido pois há necessidade de se limitar a influência da incerteza na estabilidade do material na incerteza combinada de certificação, conforme será discutido no próximo item desse trabalho. É provável que o material seja estável por tempo maior que o definido, o que pode ser confirmado com monitoramento posterior da estabilidade do material.

4.6.6 Programa colaborativo para caracterização

Dos 30 laboratórios convidados a participar do programa colaborativo para a caracterização do candidato a MR de mexilhão, 19 aceitaram o convite, sendo 10 laboratórios nacionais e nove do exterior.

Foram recebidos resultados de 14 laboratórios, sete nacionais e sete do exterior. Houve problemas com o envio dos frascos para dois laboratórios estrangeiros que, portanto, não receberam os frascos do material. Além destes, um laboratório nacional e um laboratório estrangeiro reportaram resultados sobre radionuclídeos presentes no material.

Foram reportados resultados de concentração para 43 elementos, com utilização das técnicas analíticas de INAA; k_0 -INAA; Análise por Ativação Neutrônica com Nêutrons Prontos, PGNAA; AAS (CV AAS, ET AAS e Espectrometria de Absorção Atômica com Chama, F AAS); Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado; ICP OES; Fluorescência de Raios X por Dispersão de Comprimento de Onda, WD XRF; e Espectrometria Alpha, α -Spect.

Conforme apresentado na FIG 4.6.6.1, a concentração dos elementos está distribuída em intervalo de oito ordens de grandeza, isto é, com concentrações da ordem de porcentagem em massa a aproximadamente $10 \mu\text{g kg}^{-1}$.

FIGURA 4.6.6.1 Ordens de grandeza para as concentrações dos elementos determinados no candidato a MR de mexilhão pelo programa colaborativo

Na TAB 4.6.6.1 são apresentados os resultados, em mg kg^{-1} , para os dois frascos enviados a cada laboratório. São apresentados os resultados médios e intervalos de 95 % de confiança, uma vez que nem todos os laboratórios forneceram informações sobre as incertezas expandidas associadas a seus resultados de medição.

Escolheu-se aleatoriamente os resultados de dois frascos utilizados no estudo de homogeneidade para representar os resultados do LAN no programa colaborativo, que foi codificado como Laboratório 1A. Os resultados apresentados como Laboratório 1B, foram obtidos no ITN (Portugal) pelo autor deste trabalho. As identidades dos demais participantes do programa não são informadas devido ao critério de confidencialidade adotado pelo programa.

O número de laboratórios que enviou resultados por elemento variou bastante: para alguns elementos, apenas um ou poucos laboratórios enviaram resultados, enquanto que para outros, grande parte dos laboratórios os reportaram, refletindo, ora o interesse em determinado elemento, ora a facilidade em se obter resultados com as técnicas utilizadas.

Observa-se da tabela que a maior parte dos resultados foi reportada por laboratórios que utilizam técnicas nucleares. Isto ocorreu pois os laboratórios que não enviaram os resultados são laboratórios que utilizam técnicas não nucleares. Uma hipótese para explicar o ocorrido é que, em geral, os métodos de Análise por Ativação Neutrônica são multielementares e demandam pouca manipulação da amostra, facilitando a obtenção de dados analíticos, mesmo com poucos analistas, se comparado com o esforço despendido com outras técnicas. Além disso, os laboratórios da área estão, em geral, não só familiarizados mas engajados com programas de colaboração utilizados para a certificação de materiais de referência.

É importante observar que o Laboratório 14 apresentou resultados por PGNAA para apenas uma alíquota de um único frasco do material. A PGNAA apresenta a vantagem de fornecer informações sobre a concentração de elementos que são dificilmente caracterizados por outras técnicas analíticas, tais como B, C, H, N, O e S (LINDSTRON, 1998). Ainda que a técnica seja ferramenta poderosa para a certificação de MRs, os resultados apresentados neste trabalho para esses elementos só podem ser utilizados como valores de referência devido ao número limitado de valores reportados.

4.6.6.1 Determinação de valores de consenso

Para a análise dos dados do programa colaborativo, inicialmente construíram-se gráficos de Youden, como os apresentados na FIG 4.6.6.2 para elementos selecionados, com a utilização de planilha eletrônica (Microsoft Excel). Os gráficos para os demais elementos encontram-se no APÊNDICE J.

O gráfico de Youden é utilizado para a análise gráfica de resultados de programas interlaboratoriais, quando cada laboratório apresentou dois resultados para um mesmo produto ou amostra ou resultados para duas amostras diferentes. Trata-se de método simples mas efetivo para a comparação da variabilidade entre laboratórios, mas também dentro de cada laboratório. É possível visualizar, até mesmo de forma quantitativa, dependendo do programa estatístico utilizado, se há laboratórios com problemas de repetitividade (variação intralaboratorial), com problemas de reprodutibilidade (variação interlaboratorial) e se há laboratórios cujos resultados são considerados extremos e, portanto, passíveis de serem eliminados (NIST e SEMATECH, 2009).

TABELA 4.6.6.1 Resultados reportados, em mg kg⁻¹, pelos participantes do programa colaborativo para caracterização do candidato a MR de mexilhão para os dois frascos enviados (base seca)^a

	1A	1B	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
	INAA, AAS	k ₀ -INAA	WD XRF	ICP OES, AAS	ICP OES	α-Spec.	k ₀ -INAA	ICP OES/FAAS	ICP OES	INAA	INAA	k ₀ -INAA	k ₀ -INAA	k ₀ -INAA	PGNAA	INAA
Ag	2,37±0,13 2,33±0,11	-	-	-	-	-	-	-	-	2,13±0,09 2,12±0,07	-	-	2,85±0,12 3,25±0,43	2,48±0,01 2,48±0,03	-	2,52±0,13
Al, %	-	50,4±6,3 55,9±5,6	-	0,1004±0,005 0,1148±0,003	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1140±0,0075 0,110±0,0103	-	0,1100±0,0033
As	14,33±0,60 14,46±0,59	-	-	-	-	-	13,89±0,29 13,93±0,38	-	10,14±0,29 10,60±0,15	13,93±0,74 15,01±0,57	11,37±0,67 12,70±0,43	12,85±0,65 13,23±0,60	16,6±3,6 17,4±2,8	13,90±0,25 13,93±0,38	-	12,30±0,25
B, %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9,39±0,55	-
Br	205,4±6,0 213,3±11	190±10 200±12	-	-	-	-	278,8±1,6 278,3±1,1	-	-	228,5±6,7 235,8±5,5	257,8±7,8 293,2±15	250,0±6,3 251,2±4,1	290,5±4,2 292,2±2,2	269,7±1,4 268,3±1,4	-	252±2,5
C, %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	28,0±1,7	-
Ca, %	-	-	0,244±0,013 0,246±0,003	0,338±0,001 0,307±0,002	-	-	0,278±0,007 0,275±0,007	0,289±0,007 0,259±0,005	0,267±0,005 0,265±0,010	-	-	-	-	0,276±0,018 0,263±0,038	0,200±0,058	0,280±0,028
Ce	-	-	-	-	-	-	1,83±0,04 1,83±0,05	-	-	-	-	-	1,59±0,27 2,00±0,29	1,82±0,19 1,87±0,19	-	1,46±0,13
Cd	0,4649±0,0061 0,4590±0,0059	-	-	0,9337±0,0253 0,9586±0,0082	-	-	-	0,6524±0,0013 0,6523±0,0022	0,4542±0,0079 0,4888±0,0136	-	-	-	-	-	0,350±0,046	-
Cl, %	3,410±0,080 3,519±0,207	-	3,605±0,171 3,701±0,093	-	-	-	-	-	-	3,897±0,060 3,997±0,056	-	3,537±0,047 3,517±0,061	-	3,54±0,21 3,44±0,30	2,31±0,14	3,450±0,038
Co	0,856±0,057 0,867±0,022	-	2,900±0,063 3,267±0,034	-	-	-	0,814±0,014 0,814±0,046	-	0,609±0,063 0,691±0,090	0,82±0,60 0,83±0,59	0,7503±0,0068 0,8327±0,0183	0,830±0,040 0,840±0,024	0,9947±0,0050 1,0245±0,0091	0,863±0,026 0,853±0,019	-	0,8000±0,0094
Cr	1,183±0,106 1,173±0,067	-	-	-	1,43±0,39 1,22±0,23	-	1,232±0,075 1,265±0,034	-	1,022±0,043 1,148±0,118	1,195±0,086 1,178±0,086	-	1,24±0,11	0,816±0,113 0,892±0,088	-	-	1,10±0,14
Cs	0,1112±0,0092 0,1095±0,0084	-	-	-	-	-	0,1066±0,0040 0,1052±0,0048	-	-	-	-	0,0893±0,0043 0,1000±0,000	-	0,1093±0,0299 0,1077±0,0038	-	0,110±0,013
Cu	-	-	2,90±0,60 3,27±0,59	11,997±0,016 11,968±0,060	11,8±1,1 10,6±0,9	-	-	11,6±1,3 12,5±1,5	-	-	-	-	-	-	-	-
Eu	0,0293±0,0015 0,0300±0,0013	-	-	-	-	-	0,023350±0,00071 0,02407±0,00075	-	-	-	-	-	0,0451±0,0130 0,0449±0,0075	-	-	-
Fe	628±23 633±33	-	468±14 472±6	655±3 667±16	540±59 577±45	-	624,8±7,1 628,2±5,2	654±9 581±10	586±5 625±16	638±19 634±9	526±11 581±17	614±12 627±13	400±30 394±34	651±7 642±11	-	-
H, %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,80±0,22	-
Hf	-	-	-	-	-	-	0,0416±0,0012 0,0405±0,0019	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0400±0,0080

^amédia e intervalo de confiança a 95 %

TABELA 4.6.6.1 Resultados reportados, em mg kg⁻¹, pelos participantes do programa colaborativo para caracterização do candidato a MR de mexilhão para os dois frascos enviados (base seca)^a – continuação

	1A	1B	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
	INAA, AAS	k ₀ -INAA	WD XRF	ICP OES, AAS	ICP OES	α-Spec.	k ₀ -INAA	ICP OES/FAAS	ICP OES	INAA	INAA	k ₀ -INAA	k ₀ -INAA	k ₀ -INAA	PGNAA	INAA
Hg	0,196±0,013 0,192±0,017	-	-	0,1387±0,0016 0,1373±0,0042	-	-	-	-	0,0305±0,0024 0,0235±0,0020	-	-	-	-	-	-	0,120±0,048
I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12,3±1,3 12,6±1,2	-	13,3±2,1 14,0±1,1	-	12,0±2,4
K, %	-	0,706±0,258 0,785±0,078	0,625±0,028 0,634±0,013	0,8374±0,0030 0,8518±0,0034	-	-	0,940±0,053 0,946±0,050	0,934±0,072 0,773±0,055	0,772±0,007 0,746±0,044	0,872±0,039 0,869±0,034	-	-	1,016±0,104 1,026±0,094	0,843±0,014 0,847±0,014	0,590±0,035	0,810±0,024
La	0,741±0,061 0,700±0,038	-	-	-	-	-	0,839±0,016 0,856±0,014	-	-	-	0,724±0,058 0,829±0,042	-	1,00±0,19 1,11±0,17	0,800±0,086 0,844±0,149	-	0,740±0,044
Mg, %	-	0,244±0,023 0,264±0,041	0,385±0,025 0,403±0,013	0,3596±0,0011 0,3551±0,0019	-	-	-	0,3907±0,0082 0,3565±0,0057	0,4085±0,0049 0,4520±0,0176	-	-	0,348±0,020 0,350±0,019	-	0,363±0,036 0,347±0,026	0,460±0,046	0,320±0,016
Mn	25,6±3,3 27,3±8,4	-	7,88±0,83 7,70±0,37	27,57±0,41 27,35±0,35	18,3±3,0 20,1±2,3	-	-	22,62±0,45 20,43±0,19	-	-	-	-	-	22,1±0,4 21,7±1,8	-	20,70±0,83
N, %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,20±0,44	-
Na, %	1,932±0,025 1,969±0,052	2,074±0,038 2,109±0,106	3,07±0,34 3,11±0,12	2,3879±0,0083 2,4136±0,0034	-	-	2,2900±0,0139 2,2790±0,0092	2,199±0,047 2,066±0,064	2,667±0,066 2,795±0,139	2,245±0,061 2,239±0,044	-	2,055±0,033 2,060±0,045	2,682±0,106 2,725±0,078	2,243±0,038 2,240±0,090	1,370±0,082	2,110±0,021
Ni	-	-	1,67±0,26 1,72±0,12	7,952±0,009 8,609±0,037	6,23±0,52 6,35±1,35	-	-	-	5,67±0,05 6,16±0,14	-	-	-	-	-	-	-
O, %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	54,0±2,7	-
P, %	-	-	1,592±0,103 1,617±0,048	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,790±0,066	-
Pb	0,509±0,017 0,537±0,037	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,387±0,057	-	-	-	-
Rb	4,45±0,20 4,79±0,19	-	-	-	-	-	5,106±0,055 5,061±0,029	-	-	-	-	4,62±0,10 4,52±0,14	7,0±1,4 7,3±1,4	4,80±0,25 4,63±0,52	-	4,30±0,26
S, %	-	-	1,798±0,105 1,834±0,036	2,637±0,062 2,624±0,061	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,050±0,064	-
Sc	0,1935±0,0076 0,1940±0,0059	-	-	-	-	-	0,1997±0,0014 0,2003±0,0010	-	-	0,1942±0,0036 0,1913±0,0026	0,187±0,010 0,199±0,011	0,200±0,000 0,200±0,000	0,238±0,010 0,246±0,017	0,2063±0,0010 0,2030±0,0010	-	0,1900±0,0038
Se	4,36±0,13 4,50±0,22	-	2,637±0,062 2,624±0,061	-	-	-	4,977±0,027 4,983±0,048	-	4,053±0,037 4,778±0,192	4,44±0,13 4,55±0,13	3,85±0,24 4,57±0,38	-	4,30±0,41 3,79±0,41	4,74±0,29 4,78±0,19	-	4,59±0,14
Si, %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,160±0,014	-

^amédia e intervalo de confiança a 95 %

TABELA 4.6.6.1 Resultados reportados, em mg kg^{-1} , pelos participantes do programa colaborativo para caracterização do candidato a MR de mexilhão para os dois frascos enviados (base seca)^a - continuação

	1A	1B	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
	INAA, AAS	k_0 -INAA	WD XRF	ICP OES, AAS	ICP OES	α -Spec.	k_0 -INAA	ICP OES/FAAS	ICP OES	INAA	INAA	k_0 -INAA	k_0 -INAA	k_0 -INAA	PGNAA	INAA
Sm	-	-	-	-	-	-	0,1505±0,0034 0,1539±0,0040	-	-	-	-	-	-	-	-	0,120±0,014
Sr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	36±9 32±11	-	24,0±4,8
Th	0,267±0,010 0,262±0,017	-	-	-	-	0,332±0,035 0,443±0,013	0,2835±0,0051 0,2845±0,0051	-	-	-	-	0,2483±0,0079 0,2617±0,0123	0,309±0,035 0,345±0,030	0,279±0,000 0,281±0,016	-	0,250±0,013
Ti	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	140±56	-
U	-	-	-	-	-	0,117±0,024 0,106±0,028	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V	1,54±0,14 1,69±0,22	-	-	3,822±0,036 3,964±0,078	-	-	-	-	-	-	-	2,93±0,60 3,12±0,68	-	3,10±1,30 3,19±0,29	30,0±5,1	-
Yb	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,241±0,035 0,308±0,048	-	-	-
Zn	118,5±3,6 119,5±2,5	-	94,67±2,17 95,33±0,86	168,5±1,3 167,5±1,1	89,7±8,5 91,9±7,0	-	121,05±0,80 120,91±0,68	135,2±8,6 113,4±4,6	120,50±0,57 125,17±4,27	113,0±3,2 112,8±3,1	117,5±3,8 123,3±10,9	115,2±1,5 116,7±2,5	140,5±6,0 138,5±11,8	122,7±2,9 121,7±3,8	-	114,0±2,3

^amédia e intervalo de confiança a 95 %

FIGURA 4.6.6.2 Gráficos de Youden para os resultados do programa colaborativo para elementos selecionados. Médias robustas H15 (—)

Para Ag e As, a maior parte dos resultados ficou distribuída ao redor da média robusta. Ainda assim, pode-se observar claramente que os resultados do Laboratório 12 para Ag e Laboratório 8 para As apresentaram tendência em relação aos demais resultados

dos respectivos conjuntos de dados. Para As, o Laboratório 12 também apresentou um resultado mais elevado do que o esperado e maior variabilidade interna nos resultados. Comportamento semelhante foi observado para maior parte dos elementos do estudo e pode refletir diferenças na capacidade analítica dos laboratórios do programa. Apesar dessas variações, os dados desses laboratórios não foram suprimidos para a determinação das estimativas da concentração dos elementos por média robusta.

Para o elemento cobalto, os resultados reportados pelo Laboratório 2 podem claramente ser classificados como valores extremos, como observado do gráfico Co - a, se comparado com o gráfico Co - b. Nesse caso, o Laboratório 2 foi eliminado para a determinação das estimativas de concentração. Os dados do Laboratório 2 também foram excluídos para a estimativa da concentração de Cu, Mn, Fe e Zn. Como esse laboratório foi o único participante do programa a determinar os elementos por WD XRF, há a possibilidade de que essas diferenças sejam devidas a problemas com essa técnica, o que necessita ser melhor investigado pelo laboratório, de preferência com a determinação dos elementos em outro laboratório que utilize a mesma técnica para confirmação dos resultados.

Além desses, também foram excluídos os dados dos seguintes laboratórios na determinação dos valores de consenso: Laboratório 1 para Al; Laboratórios 3 e 4 para Zn; Laboratório 8 para Hg; Laboratório 12 para Fe e Laboratório 14 para Cl e V.

O consenso de participantes de programas colaborativos é o método mais utilizado para a determinação de valores de concentração e parte dos pressupostos de que a maioria dos resultados não apresentam tendências e que é possível medir rapidamente a dispersão dos dados. Quando a distribuição dos resultados é unimodal e, excetuando valores extremos, relativamente simétrica, as várias medidas de tendência central, tais como a média, a mediana, a moda, são aproximadamente coincidentes. No entanto, é preferível a utilização de médias robustas na obtenção do valor de consenso e de suas medidas de dispersão, que são mais afetadas por valores extremos do que as medidas de tendência central (THOMPSON e col., 2006). Nesse contexto, o termo “robusto” deve ser entendido como insensibilidade à pequenos desvios das suposições, como por exemplo, desvios da condição de normalidade da distribuição dos dados ou presença de valores que podem estar distantes do conjunto de observações, com a possibilidade de serem valores errados (WILLINK, 2008).

Os métodos de Estatística Robusta consistem de mudanças na prática da Estatística Clássica. Nesse tipo de estatística, ao invés da rejeição de valores extremos, é realizada a acomodação desses valores (AMC, 1989). No cálculo da média e do desvio padrão robustos, peso menor é dado aos valores extremos. Assim, as estimativas robustas são insensíveis a quanto esses estão deslocados, uma vez que a maior parte de sua informação vem dos valores do centro do conjunto de dados.

Para se estimar os valores de consenso para as concentrações dos elementos a partir dos resultados dos participantes do programa colaborativo, utilizou-se a Recomendação 1 do Protocolo Harmonizado Internacional para Testes de Proficiência de Laboratórios de Química Analítica da IUPAC (THOMPSON e col., 2006).

Inicialmente, são excluídos dados identificados como inválidos, tais como os resultados fora do intervalo de $\pm 50 \%$ da mediana de todos os resultados. Posteriormente, calcula-se a média robusta de Hubert, H15 (também denominada de algoritmo A de Hubert) e seu desvio padrão, s_{H15} . A média robusta é tomada como a estimativa da concentração e a incerteza padrão devida à caracterização, u_{car} , é estimada por $s_{H15}/\sqrt{n_i}$, onde n_i é o número de conjuntos de resultados utilizados. No caso deste trabalho, em geral são dois conjuntos por laboratório, com seis determinações cada.

A média robusta H15 foi calculada utilizando-se algoritmo compilado na linguagem de computação Fortran 77, que também fornece outra estimativa robusta para a média, o A15 e seu desvio padrão, s_{A15} . A média A15 é considerada estimativa robusta aproximada para a média (AMC, 1989).

Para avaliar o impacto de valores extremos na estimativa dos valores de concentração e a adequação do uso da média robusta H15, são apresentados na TAB 4.6.6.2 as estimativas para valores de tendência central e suas dispersões calculados por métodos diferentes.

TABELA 4.6.6.2 Estimativas para os valores de tendência central e incertezas de caracterização, mg kg^{-1} , para os resultados do programa colaborativo para caracterização do candidato a MR de mexilhão

	Estatística Clássica				Estatística Robusta							
	Média	DP	M_{ANOVA}	u_{ANOVA}	Mediana	MAD	A15	u_{A15}	H15	u_{H15}	M_{M}	u_{M}
Ag	2,49	0,40	2,49	0,13	2,449	0,050	2,45	0,11	2,45	0,11	2,47	0,11
Al, %	0,120	0,015	0,1196	0,0058	0,1150	0,0031	0,1200	0,0067	0,120	0,0067	0,114	0,0053
As	13,8	2,1	13,77	0,45	13,90	0,31	13,7	0,37	13,7	0,37	13,9	0,44
Br	250	35	249,8	8,5	254,0	2,5	249,9	9,5	250	9,5	252,0	8,0
Ca, %	0,275	0,027	0,2751	0,0072	0,2700	0,0021	0,2709	0,0035	0,2709	0,0035	0,2741	0,0084
Cd	0,62	0,20	0,618	0,073	0,4940	0,0057	0,614	0,073	0,614	0,073	0,487	0,073
CE	1,81	0,20	1,812	0,054	1,820	0,046	1,819	0,049	1,819	0,049	1,821	0,075
Cl, %	3,63	0,21	3,627	0,059	3,580	0,046	3,624	0,066	3,624	0,066	3,540	0,060
Co	0,83	0,10	0,830	0,023	0,826	0,015	0,829	0,016	0,829	0,016	0,830	0,023
Cr	1,16	0,19	1,163	0,038	1,170	0,064	1,160	0,042	1,160	0,042	1,170	0,036
Cs	0,1061	0,0081	0,1061	0,0015	0,1056	0,0027	0,1056	0,0025	0,1056	0,0025	0,1080	0,0014
Cu	11,7	1,1	11,75	0,25	11,97	0,36	11,72	0,40	11,72	0,40	11,78	0,28
Eu	0,0310	0,0098	0,0310	0,0035	0,0287	0,0012	0,0292	0,0024	0,0292	0,0024	0,0299	0,0032
Fe	617	40	595	18	626,1	7,3	598,1	9,2	585	17	625	19
Hf	0,0410	0,0022	0,04101	0,00041	0,0417	0,0013	0,0411	0,0013	0,04	0,0013	0,04051	0,00050
Hg	0,167	0,032	0,167	0,015	0,1729	0,0055	0,167	0,016	0,17	0,016	0,139	0,016
I	12,8	1,2	12,81	0,33	12,90	0,43	12,88	0,52	12,88	0,52	12,80	0,40
K, %	0,84	0,13	0,841	0,027	0,848	0,018	0,810	0,036	0,81	0,036	0,84	0,027
La	0,84	0,14	0,838	0,038	0,824	0,025	0,817	0,030	0,82	0,030	0,820	0,040
Mg, %	0,360	0,057	0,360	0,014	0,3600	0,0061	0,365	0,011	0,36	0,011	0,359	0,014
Mn	23,3	4,1	23,3	1,1	22,44	0,43	23,36	0,90	23,36	0,90	22,0	1,1
Na, %	2,34	0,35	2,337	0,071	2,270	0,020	2,27	0,058	2,27	0,058	2,24	0,079
Ni	5,6	2,5	5,64	0,88	6,0	2,9	5,63	0,95	5,6	0,95	6,15	0,94
P, %	1,54	0,24	1,54	0,17	1,614	0,064	1,592	0,053	1,592	0,053	1,59	0,27
Pb	0,501	0,064	0,501	0,040	0,516	0,022	0,506	0,035	0,506	0,035	0,514	0,043
Rb	5,2	1,1	5,20	0,30	4,99	0,10	4,93	0,14	4,93	0,14	4,80	0,30
S, %	2,18	0,47	2,18	0,24	1,896	0,047	2,19	0,22	2,19	0,22	1,83	0,30
Sc	0,203	0,017	0,2031	0,0043	0,2000	0,0012	0,1993	0,0021	0,1993	0,0021	0,2000	0,0046
Se	4,29	0,74	4,29	0,18	4,491	0,062	4,42	0,13	4,42	0,13	4,57	0,17
Sm	0,1506	0,0087	0,1506	0,0055	0,1528	0,0016	0,1517	0,0032	0,1517	0,0032	0,151	0,011
Sr	32,6	5,6	32,6	3,0	32,00	0,50	32,6	3,7	32,6	3,7	29,0	4,1
Th	0,287	0,041	0,287	0,011	0,2800	0,0062	0,2800	0,0070	0,280	0,0070	0,282	0,015
U	0,1115	0,0063	0,1115	0,0051	0,1117	0,0020	0,1115	0,0051	0,1115	0,0051	0,1115	0,0051
V	2,9	1,0	2,89	0,33	3,19	0,15	2,89	0,38	2,89	0,38	3,11	0,32
Yb	0,274	0,052	0,274	0,046	0,279	0,033	0,273	0,040	0,273	0,040	0,271	0,032
Zn	121,8	9,1	121,8	1,9	121,8	1,5	119,6	2,1	119,6	2,1	120,5	1,8

Os estimadores mais simples são a média e o desvio padrão, DP, muito suscetíveis à influência de valores extremos. Por outro lado, a mediana e o desvio absoluto da mediana, MAD, são estimadores robustos do valor central e da dispersão dos resultados. O MAD é calculado de acordo com a Equação 4.12:

$$\text{MAD} = \text{Mediana}(|Y_i - \tilde{Y}|) \quad (4.12)$$

Onde: $\tilde{Y}$ é a mediana dos dados e Y_i são os valores individuais.

A estimativa da média a partir de ANOVA e sua incerteza de caracterização, u_{ANOVA} , são calculadas a partir dos parâmetros da ANOVA realizada com os resultados, de acordo com as recomendações do ISO Guia 35 (ISO, 2006). A u_{ANOVA} é calculada de acordo com as Equações 4.13 a 4.16:

$$u_{\text{ANOVA}} = \sqrt{\frac{s_L^2}{p} + \frac{s_r^2}{n p}} \quad (4.13)$$

onde:

$$s_r^2 = \text{MQ}_{\text{dentro}} \quad (4.14)$$

$$s_L^2 = \frac{\text{MQ}_{\text{entre}} - \text{MQ}_{\text{dentro}}}{n_0} \quad (4.15)$$

$$n_0 = \frac{1}{a-1} \left[\sum_{i=1}^a n_i - \frac{\sum_{i=1}^a n_i^2}{\sum_{i=1}^a n_i} \right] \quad (4.16)$$

Os termos s_r^2 e s_L^2 são as estimativas da variância dentro do frasco e entre frascos, respectivamente e são obtidos dos parâmetros de média quadrática da tabela de ANOVA, ($\text{MQ}_{\text{dentro}}$ e MQ_{entre}). O termo n_0 é correção para o n , número de determinações, no caso de faltarem valores na tabela de ANOVA. O termo p é o número de conjuntos de resultados, a é o número de resultados por conjunto.

As estimativas robustas A15 e H15 e seus respectivos desvios padrão são calculados por método iterativo. As incertezas associadas foram calculadas dividindo-se os respectivos desvios padrão pela raiz quadrada do número de conjuntos de dados para cada elemento.

A estimativa de tendência central mediana das medianas, M_M , é calculada como a mediana das medianas de cada conjunto de dados. Seu desvio padrão é dado pelo desvio padrão das medianas enquanto que a incerteza associada é estimada como o desvio padrão dividido pela raiz quadrada do número de conjuntos de dados para cada elemento (SHAKASHIRO, 2009).

Para a maior parte dos elementos foi observada concordância entre as médias calculadas para todos os elementos, tanto por estatística clássica quanto por robusta, o que mostra que o conjunto de dados é homogêneo e com pouca influência de valores extremos. Ainda assim, pequenas discrepâncias podem ser observadas entre as estimativas clássica e robusta para os elementos Na, Rb, Se e Th. Para os elementos Cd, Hg, Ni, Pb, S e V, a mediana e a M_M ainda que concordantes entre si, se apresentaram deslocadas das demais estimativas.

Quanto às medidas de dispersão, foi observada maior variação entre cada tipo de estimativa. Uma vez que o desvio padrão é muito influenciado por valores extremos, essa estimativa de dispersão foi muito maior que as demais estimativas para todos os elementos, com exceção do Ni. Em situação oposta, o MAD, uma estimativa de dispersão para a mediana, apresentou valores mais baixos para quase todos os elementos. Finalmente e o mais importante, as diversas estimativas de incerteza de caracterização apresentaram valores concordantes. Tomou-se a incerteza padrão associada à média robusta H15, u_{H15} , como a incerteza padrão de caracterização dos elementos, u_{car} .

Para elementos selecionados, na FIG. 4.6.6.3 são apresentados os resultados fornecidos pelos participantes do programa colaborativo em forma gráfica, bem como os valores de média robusta H15 e incerteza padrão expandida associada à caracterização, com fator de abrangência $k = 2$. No Apêndice K são apresentados os gráficos para os demais elementos.

FIGURA 4.6.6.3 Média e intervalo de confiança em base seca (frascos A e B), ordenados por ordem de concentração, para os resultados reportados pelos participantes do programa colaborativo para caracterização do candidato a MRC. Média robusta H15 (———), Incerteza expandida de caracterização, $k = 2$ (-----)

FIGURA 4.6.6.3 Média e intervalo de confiança em base seca (frascos A e B), ordenados por ordem de concentração, para os resultados reportados pelos participantes do programa colaborativo para certificação do candidato a MRC. Média robusta H15 (———), Incerteza expandida de caracterização, $k = 2$ (- - - - -) – continuação

As estimativas dos valores de consenso para a concentração apresentaram boa concordância com a distribuição dos dados para grande número de elementos como se pode visualizar dos gráficos para Ca, Na Se e Zn. Para elementos como o Cd, com reduzido número de laboratórios com resultados reportados, os gráficos refletem a menor confiança nas estimativas dos valores de consenso. A média robusta H15 para Fe parece ter sido influenciada pela assimetria da distribuição, que se apresenta deslocada para valores mais baixos e, portanto, a maior parte dos laboratórios se localizaram acima do limite superior da incerteza expandida. A média H15 é menos robusta que a mediana para o caso de distribuições assimétricas e, portanto, a concentração de 626,1 mg kg⁻¹ (mediana) é mais apropriada como estimativa de valor central para esse elemento (THOMPSON e col., 2006).

4.6.6.2 Atribuição de valores certificados

Para a atribuição de valores certificados, a primeira etapa é a estimativa das incertezas expandidas associadas aos valores de concentração, U_{MRC} . Para isso, são levadas em consideração, além da incerteza padrão devida à caracterização dos elementos no programa colaborativo, u_{car} , calculada no item anterior desse estudo, a incerteza padrão devida à homogeneidade entre frascos, u_{bb} ; a incerteza padrão devida à estabilidade a curto prazo, u_{sts} , e a incerteza padrão devida à estabilidade a longo prazo, u_{lts} . Essas contribuições de incerteza são combinadas para se calcular as incertezas padrão combinadas associadas aos valores de concentração, u_{MRC} . Tomando-se um fator de abrangência $k = 2$ e multiplicando-se k por u_{MRC} , se obtém a estimativa de U_{MRC} , conforme a Equação 4.17 (ISO, 2006):

$$U_{MRC} = k \sqrt{u_{car}^2 + u_{bb}^2 + u_{lts}^2 + u_{sts}^2} \quad (4.17)$$

4.6.6.2.1 Estimativa de incertezas padrão devidas à homogeneidade entre frascos

A partir dos resultados dos testes de ANOVA para a igualdade de médias, apresentados no item 4.5.2, estimou-se as incertezas padrão devidas à homogeneidade entre frascos para os elementos determinados por INAA, k_0 -INAA e AAS (ISO, 2006).

Calcula-se o desvio padrão de repetitividade, s_r , e o desvio padrão de homogeneidade entre frascos, s_{bb} , conforme as Equações 4.14 e 4.15.

O s_{bb} pode ser tomado como estimativa para a incerteza padrão devida à homogeneidade entre frascos, u_{bb} , que é utilizada como componente da incerteza padrão combinada para a certificação. No entanto, como observado da TAB 4.6.6.3, com exceção da prata, os valores de s_{bb} foram menores que os valores de s_r , indicando que a repetitividade dos métodos utilizados não foi baixa o suficiente para o estudo de homogeneidade entre frascos.

TABELA 4.6.6.3 Estimativa da incerteza padrão devida à homogeneidade entre frascos, em mg kg^{-1} , para resultados obtidos por INAA, k_0 -INAA e AAS

Elemento	s_r	s_{bb}	u'_{bb}
Ag	0,062	0,080	0,081
Al	5,6	1,4	1,5
As	0,26	0,10	0,12
Br	13	2,6	2,9
Br ¹	14	5,8	6,0
Cd	0,020	0,0040	0,0047
Cl, % ¹	0,24	0,088	0,092
Co	0,035	0	0,0031
Cr	0,099	0	0,0087
Cs	0,012	0,00030	0,0011
Eu	0,0019	0	0,00021
Fe	20	3,9	4,6
Hg	0,018	0	0,0018
K, % ¹	0,12	0	0,014
La	0,043	0	0,0063
Mg, % ¹	0,030	0	0,0034
Mn ¹	4,2	0	0,47
Na, %	0,092	0,021	0,022
Na, % ¹	0,066	0	0,0074
Pb	0,041	0,010	0,011
Rb	0,26	0,067	0,072
Sc	0,0042	0,0023	0,0024
Se	0,15	0,024	0,030
Th	0,015	0	0,0017
V ¹	0,16	0,064	0,066
Zn	2,3	0,73	0,83

¹resultados obtidos por k_0 -INAA

Para esses casos, o ISO Guia 35 sugere que se utilize a expressão apresentada na Equação 4.18 para se estimar a incerteza padrão devida à homogeneidade entre frascos com método de repetitividade insuficiente, u'_{bb} , que está sob influência da variância de repetitividade:

$$u'_{bb} = \sqrt{s_{bb} + \frac{MQ_{dentro}}{n} \sqrt[4]{\frac{2}{v_{MQ_{dentro}}}}} \quad (4.18)$$

Com essa expressão, é possível estimar a variabilidade máxima entre frascos que poderia ser mascarada pela variabilidade do método. O termo em raiz quarta surge pois se leva em consideração a incerteza em MQ_{dentro} , ou seja, a variância de uma variância (LINSINGER e col., 2001).

A u'_{bb} foi tomada como incerteza padrão devida à homogeneidade entre frascos.

4.6.6.2.2 Estimativa de incertezas padrão devidas à estabilidade

A estimativa de incertezas padrão devidas à estabilidade a curto prazo são desconsideradas no cálculo das u_{MRC} , uma vez que só há confiabilidade no uso de um MRC para o qual as condições de transporte foram adequadas e não houve degradação do material durante o processo. Assim, esse item se refere à estimativa de incertezas padrão devidas à estabilidade a longo prazo.

Essa estimativa está relacionada ao tempo de prateleira designado para o MRC. Espera-se que, quanto maior o tempo de prateleira, maior o valor da contribuição da incerteza na estabilidade para a incerteza combinada do MRC.

Sugerem-se no ISO Guia 35 que u_a a incerteza no coeficiente angular a da curva de regressão linear da concentração em função do tempo seja multiplicado por um tempo de prateleira adequado em meses e utilizada como a estimativa de u_{lts} (ISO, 2006).

A incerteza u_a é facilmente obtida do relatório do teste de ANOVA para regressão linear. No entanto, para tempos de prateleira usualmente designados para este tipo de matriz, observou-se que os valores de u_{lts} obtidos foram altos se comparados a u_{car} . Aparentemente, a abordagem do ISO Guia 35 é muito conservadora, possivelmente porque ela assume que a degradação ocorre em um ritmo constante, seguindo o modelo linear. Em geral, essa premissa não é seguida para a concentração de elementos em materiais de

referência biológicos, que tendem a ser estáveis por certo tempo e, então, se degradar rapidamente. Para contornar esse problema, optou-se, nesse estudo, por tomar estimativas de u_{lis} para tempos de prateleira mais baixos, de forma a se obter valores de contribuição aceitáveis em comparação aos valores da incerteza padrão combinada de certificação. Então, propõe-se esquema de monitoramento da estabilidade após a certificação, de forma a ampliar o tempo de prateleira do material.

Apresentam-se na TAB 4.6.6.4 os coeficientes angulares e suas incertezas associadas obtidos do teste de ANOVA para regressão linear do estudo de estabilidade a longo prazo. Foram calculadas as estimativas de u_{lis} para período de 24 meses, também apresentados na tabela. O motivo para a escolha desse tempo de prateleira será discutido no próximo sub-item.

TABELA 4.6.6.4 Estimativa da incerteza padrão devida à estabilidade a longo prazo, em mg kg^{-1} , para resultados obtidos por INAA e AAS e tempo de prateleira de 24 meses

Elemento	$a, \text{mg kg}^{-1} \text{mês}^{-1}$	$u_a, \text{mg kg}^{-1} \text{mês}^{-1}$	u_{lis}
Ag	-0,0008	0,0063	0,15
As	0,003	0,034	0,82
Br	1,57	0,78	19
Cd	0,53	0,46	0,011
Co	-0,0017	0,0015	0,035
Cr	0,0043	0,0053	0,13
Cs	-0,00021	0,00053	0,013
Eu	0,00001	0,00014	0,0035
Fe	0,19	0,97	23
Hg	0,18	0,74	0,018
La	0,0005	0,0026	0,062
Na, %	0,0140, % mês^{-1}	0,0071, % mês^{-1}	0,17
Pb	-0,456	1,669	0,040
Rb	-0,008	0,018	0,43
Sc	-0,00012	0,00046	0,011
Se	-0,0007	0,0075	0,18
Th	-0,00076	0,00080	0,019
Zn	-0,03	0,17	4,2

4.6.6.2.3 Estimativa de incertezas padrão dos valores de propriedade

Na TAB 4.6.6.5 são apresentadas as estimativas de incerteza padrão combinadas para os valores de concentração dos elementos analisados no programa colaborativo. As estimativas u_{MRC} foram calculadas de acordo com a Equação 4.17.

Para os elementos do programa colaborativo que não foram determinados nos estudos de homogeneidade e estabilidade, tomou-se como estimativa de u_{bb} e u_{lts} 2 % e 5 % do valor da concentração, respectivamente. Esses valores foram utilizados pois são próximos aos resultados médios obtidos para os demais elementos nos testes.

Para avaliação da contribuição dos componentes de incerteza para a incerteza padrão combinada, os resultados da TAB 4.6.6.5 foram apresentados na FIG 4.6.6.4 para elementos selecionados. Os gráficos para os demais elementos são apresentados no Apêndice L.

Mesmo com a definição do tempo de prateleira de 24 meses, período considerado curto para MRCs biológicos de origem marinha, que em geral possuem tempo de prateleira entre cinco e dez anos, foi observado que a u_{lts} foi a maior contribuição à incerteza combinada para a maioria dos elementos, assumindo valores maiores que a u_{car} . Ainda que esse resultado possa não ser o desejável, é indicação de que o método utilizado para o cálculo de u_{lts} parece fornecer estimativas superestimadas.

Conforme o esperado, a não homogeneidade residual do lote de material forneceu a menor contribuição à incerteza padrão combinada para a maior parte dos elementos.

TABELA 4.6.6.5 Estimativas das incertezas padrão combinadas, em mg kg^{-1} , para os valores de concentração dos elementos analisados no programa colaborativo para caracterização do candidato a material de referência de mexilhão

Elemento	C	u_{car}	u_{bb}	u_{its}	u_{MRC}
Ag	2,45	0,11	0,081	0,15	0,20
Al, %	0,12	0,0067	0,0024	0,0060	0,0093
As	13,7	0,37	0,12	0,82	0,9
Br	250	9,5	2,9	19	21
Ca, %	0,2709	0,0035	0,0054	0,014	0,0150
Cd	0,614	0,073	0,0047	0,011	0,074
Ce	1,819	0,049	0,036	0,091	0,110
Cl, %	3,624	0,066	0,092	0,18	0,21
Co	0,829	0,016	0,0031	0,035	0,038
Cr	1,16	0,042	0,0087	0,13	0,13
Cs	0,1056	0,0025	0,0011	0,013	0,013
Cu	11,72	0,4	0,23	0,59	0,75
Eu	0,0292	0,0024	0,00021	0,0035	0,0042
Fe	585	17	4,6	23	29
Hf	0,04	0,0013	0,00080	0,0020	0,0025
Hg	0,17	0,016	0,0018	0,018	0,024
I	12,88	0,52	0,26	0,64	0,87
K, %	0,81	0,036	0,014	0,041	0,056
La	0,82	0,03	0,0063	0,062	0,070
Mg, %	0,36	0,011	0,0034	0,018	0,021
Mn	23,36	0,9	0,47	1,2	1,5
Na, %	2,27	0,058	0,022	0,17	0,18
Ni	5,6	0,95	0,11	0,28	1,00
P, %	1,592	0,053	0,032	0,080	0,10
Pb	0,506	0,035	0,011	0,040	0,054
Rb	4,93	0,14	0,072	0,43	0,5
S, %	2,19	0,22	0,044	0,11	0,25
Sc	0,1993	0,0021	0,0024	0,011	0,011
Se	4,42	0,13	0,03	0,18	0,22
Sm	0,1517	0,0032	0,0030	0,0076	0,0088
Sr	32,6	3,7	0,65	1,6	4,1
Th	0,28	0,007	0,0017	0,019	0,020
U	0,1115	0,0051	0,0022	0,0056	0,0079
V	2,89	0,38	0,066	0,14	0,41
Yb	0,273	0,04	0,0055	0,014	0,043
Zn	119,6	2,1	0,83	4,2	4,7

FIGURA 4.6.6.4 Contribuições da incerteza de caracterização, u_{car} , da incerteza devida à homogeneidade, u_{bb} e da incerteza devida à estabilidade a longo prazo, u_{lts} , para as incertezas padrão combinadas associadas aos valores de concentração, u_{MRC} , para elementos selecionados no candidato a MR de mexilhão

4.6.6.2.4 Atribuição dos valores de propriedade

Para a atribuição dos valores de propriedade e, em particular, dos valores certificados, para elementos no candidato a MR de mexilhão, optou-se por fazer a seguinte distinção entre os valores:

- valores informativos são valores para os quais há pouca confiabilidade metrológica nos resultados;
- valores de referência são valores para os quais há maior confiabilidade nos dados, mas para os quais essa confiabilidade não é suficiente para que se recomende a certificação;
- valores certificados são valores com maior confiabilidade metrológica, para os quais a certificação é considerada possível.

Para a definição de quais elementos se encaixam nas definições acima, utilizaram-se as informações apresentadas na TAB 4.6.6.6.

TABELA 4.6.6.6 Informações para a decisão sobre a atribuição de valores certificados ao candidato a material de referência de mexilhão^a

Elemento	nº de Labs.	Técnicas	U, %	Decisão		
				Valor informativo	Valor de referência	Valor certificado
Ag	4	INAA, k_0 -INAA	adequada		X	
Al, %	4 (1)	INAA, k_0 -INAA, ICP OES	adequada	X		
As	9	INAA, k_0 -INAA, ICP OES	adequada			X
B, %	1	PGNAA	-	X		
Br	9	INAA, k_0 -INAA	adequada		X	
C, %	1	PGNAA	-	X		
Ca, %	8	INAA, k_0 -INAA, ICP OES, PGNAA, WD XRF	adequada			X
Cd	5	AAS, ICP OES, PGNAA	alta		X	
Ce	4	INAA, k_0 -INAA	adequada		X	
Cl, %	7 (1)	INAA, k_0 -INAA, WD XRF (PGNAA)	adequada			X
Co	10 (1)	INAA, k_0 -INAA, ICP OES (WD XRF)	adequada			X
Cr	8	INAA, k_0 -INAA, ICP OES, PGNAA, WD XRF	alta		X	
Cs	5	INAA, k_0 -INAA	alta		X	
Cu	4 (1)	ICP OES, (WD XRF)	adequada	X		
Eu	3	INAA, k_0 -INAA	alta	X		
Fe	12 (2)	INAA, k_0 -INAA, ICP OES, (WD XRF)	adequada		X	
H, %	1	PGNAA	-	X		
Hf	2	INAA, k_0 -INAA, ICP OES, PGNAA, WD XRF	adequada	X		
Hg	4 (1)	INAA, ICP OES	alta		X	
I	3	INAA, k_0 -INAA	adequada	X		
K, %	11	INAA, k_0 -INAA, ICP OES, PGNAA, WD XRF	adequada			X
La	6	INAA, k_0 -INAA	adequada		X	
Mg, %	9	INAA, k_0 -INAA, ICP OES, PGNAA, WD XRF	adequada			X
Mn	7 (1)	INAA, k_0 -INAA, ICP OES, PGNAA, (WD XRF)	adequada			X
N, %	1	PGNAA	-	X		
Na, %	13	INAA, k_0 -INAA, ICP OES, PGNAA, WD XRF	adequada			X
Ni	4	ICP OES, WD XRF	muito alta	X		
O, %	1	PGNAA	-	X		
P, %	2	PGNAA, WD XRF	adequada	X		
Pb	2	AAS, k_0 -INAA	alta	X		
Rb	6	INAA, k_0 -INAA	adequada		X	
S, %	3	ICP OES, PGNAA, WD XRF	alta	X		

^aEm parênteses: número de laboratórios e técnicas excluídos na atribuição de valores de concentração

TABELA 4.6.6.6 Informações para a decisão sobre a atribuição de valores certificados ao candidato a material de referência de mexilhão^a - continuação

Elemento	n° de Labs.	Técnicas	U, %	Decisão		
				Valor informativo	Valor de referência	Valor certificado
Sc	8	INAA, k_0 -INAA,	alta		X	
Se	8	INAA, k_0 -INAA, ICP OES, (WD XRF)	adequada			X
Si, %	1	PGNAA	-	X		
Sm	2	INAA, k_0 -INAA	adequada	X		
Sr	2	INAA, k_0 -INAA	alta	X		
Th	7	INAA, k_0 -INAA, α -Spect.	adequada			X
Ti	1	PGNAA	-	X		
U	1	α -Spect.	adequada	X		
V	5 (1)	INAA, k_0 -INAA, ICP OES, (PGNAA)	alta		X	
Yb	1	k_0 -INAA	muito alta	X		
Zn	13 (3)	INAA, k_0 -INAA, ICP OES, (WD XRF)	adequada			X

^aEm parênteses: número de laboratórios e técnicas excluídos na atribuição de valores de concentração

Foram considerados elementos com valores informativos, aqueles para os quais poucas informações estavam disponíveis, como os elementos apresentados na TAB 4.6.6.7, determinados, com exceção do Ti, apenas por PGNAA; elementos para os quais o número de laboratórios que apresentaram resultados válidos no programa colaborativo foi menor ou igual a 3, apresentados na TAB 4.6.6.8 e os radionuclídeos, cujas concentrações de atividade são apresentadas na TAB 4.6.6.9.

TABELA 4.6.6.7 Valores informativos para a concentração, em %, atribuídos aos elementos determinados no MR de mexilhão

Elemento	Concentração ^a , %
B	9,39 $\pm$ 0,55
C	28,0 $\pm$ 1,7
H	3,80 $\pm$ 0,22
N	7,20 $\pm$ 0,44
O	54,0 $\pm$ 2,7
Ti, mg kg ⁻¹	140 $\pm$ 56
Si	0,160 $\pm$ 0,014

^aincertezas são incertezas expandidas ($k = 2$, 95 %), fornecidas pelos participantes do programa colaborativo

TABELA 4.6.6.8 Valores informativos para a concentração, em mg kg^{-1} , atribuídos aos elementos determinados no MR de mexilhão

Elemento	Concentração ^a , mg kg^{-1}	U, %
Al, %	$0,120 \pm 0,019$	16
Cu	$11,7 \pm 1,5$	13
Eu	$0,0292 \pm 0,0084$	29
Hf	$0,0400 \pm 0,0050$	13
I	$12,9 \pm 1,7$	13
Ni	$5,6 \pm 2,0$	36
P, %	$1,59 \pm 0,20$	13
S, %	$2,19 \pm 0,50$	23
Pb	$0,51 \pm 0,11$	21
Sm	$0,152 \pm 0,018$	12
Sr	$32,6 \pm 8,2$	25
U	$0,112 \pm 0,016$	14
Yb	$0,273 \pm 0,085$	31

^a:incertezas apresentadas são incertezas expandidas, calculadas usando-se fator de abrangência $k = 2$, que fornece nível de confiança de aproximadamente 95 %

TABELA 4.6.6.9 Valores informativos para a concentração de atividade, em Bq kg^{-1} , atribuídos aos elementos determinados no MR de mexilhão

Radionuclídeo	Concentração de atividade ^a , Bq kg^{-1}
⁴⁰ K	$0,0446 \pm 0,0031$
²¹⁰ Pb	$0,106 \pm 0,032$
²³² Th	$1,59 \pm 0,62$
²³⁴ U	$1,39 \pm 0,52$
²³⁵ U	$0,067 \pm 0,065$
²³⁸ U	$1,25 \pm 0,54$

^a:incertezas apresentadas são incertezas expandidas, calculadas usando-se fator de abrangência $k = 2$, que fornece nível de confiança de aproximadamente 95 %

Para os elementos cujos resultados foram apresentados por quatro ou mais laboratórios, mas para os quais não foram utilizadas pelo menos duas técnicas analíticas com princípios diferentes, considerou-se os resultados como valores de referência, como apresentado na TAB 4.6.6.10.

TABELA 4.6.6.10 Valores de referência para a concentração, em mg kg⁻¹, atribuídos aos elementos determinados no MR de mexilhão

Elemento	Concentração ^a , mg kg ⁻¹	U, %
Ag	2,45 ± 0,41	17
Br	250 ± 42	17
Cd	0,61 ± 0,15	24
Ce	1,82 ± 0,22	12
Cr	1,16 ± 0,27	23
Cs	0,106 ± 0,026	25
Fe	585 ± 58	10
Hg	0,170 ± 0,048	28
La	0,82 ± 0,14	17
Rb	4,93 ± 0,92	19
Sc	0,199 ± 0,023	11
V	2,89 ± 0,82	29

^aincertezas apresentadas são incertezas expandidas, calculadas usando-se fator de abrangência $k = 2$, que fornece nível de confiança de aproximadamente 95 %

Finalmente, foram considerados como valores certificados aqueles obtidos por quatro ou mais laboratórios, utilizando-se técnicas analíticas com pelo menos dois princípios diferentes e para os quais os resultados de concentração foram obtidos com incertezas expandidas relativas inferiores a 20 %.

Esse limite foi escolhido como o adequado para o uso pretendido para um material de referência de mexilhão nacional e para a determinação de elementos na matriz de mexilhão nas condições desse estudo. Os valores certificados são apresentados na TAB 4.6.6.11.

Os valores de incerteza expandida no intervalo de 20 % a 30 % foram considerados altos e, assim, os elementos com incerteza expandida nesse intervalo foram incluídos na TAB 4.6.6.9, dos resultados considerados como valores de referência. Valores de incerteza expandida maiores que 30 % foram consideradas muito altos e incluíram-se os elementos com incerteza expandida dessa magnitude na TAB 4.6.6.7, como valores informativos. O elemento Fe foi incluído na TAB 4.6.6.9, como valor de referência, pois não foi possível contornar de forma satisfatória a assimetria da distribuição dos valores do programa colaborativo com o uso da média robusta H15.

TABELA 4.6.6.11 Valores certificados para a concentração, em mg kg^{-1} , atribuídos aos elementos determinados no MR de mexilhão

Elemento	Concentração ^a , mg kg^{-1}	<i>U</i> , %
As	$13,7 \pm 1,8$	13
Ca, %	$0,271 \pm 0,030$	11
Cl, %	$3,62 \pm 0,43$	12
Co	$0,829 \pm 0,077$	9,3
K, %	$0,81 \pm 0,11$	14
Mg, %	$0,360 \pm 0,043$	12
Mn	$23,4 \pm 3,1$	13
Na, %	$2,27 \pm 0,36$	16
Se	$4,42 \pm 0,45$	10
Th	$0,280 \pm 0,041$	15
Zn	$119,6 \pm 9,5$	7,9

^aincertezas apresentadas são incertezas expandidas, calculadas usando-se fator de abrangência $k = 2$, que fornece nível de confiança de aproximadamente 95 %

O critério da exigência de mais de um princípio analítico para a certificação faz com que os valores obtidos para Ag, Br, Ce, Cs, La e Rb não sejam considerados certificados, mas sim de referência. Esse critério pode ser questionado pois apesar de partirem do mesmo princípio, a INAA e a k_0 -INAA utilizam métodos relativamente diferentes para a obtenção dos resultados de concentração. Com a participação do LAN em projeto da IAEA voltado às necessidades da América Latina, para a produção de novos materiais de referência na região, houve o interesse de mais alguns laboratórios em participar da caracterização do material, utilizando outras técnicas além das nucleares (IAEA, 2009b). Deste modo, espera-se que seja viável a certificação de mais elementos no candidato a MR de mexilhão em futuro próximo.

No que se refere à incerteza relativa associada ao valor de concentração, os critérios para certificação adotados neste estudo podem ser considerados restritivos, se comparados aos adotados pela IAEA na certificação de material de referência de homogeneizado de peixe (WYSE e col., 2003). No estudo realizado, o limite de 20 % para a incerteza relativa é colocado para elementos com concentrações superiores a 100 mg kg^{-1} . O limite é de 30 % para elementos com concentração na faixa de 10 a 100 mg kg^{-1} e de 50 a 60 % para elementos com concentração na faixa de 0,1 a 10 mg kg^{-1} . Caso os critérios da IAEA tivessem sido utilizados, as concentrações para os elementos Cd, Cr, Hg e V também poderiam ser consideradas certificadas. No entanto,

optou-se por manter o critério mais restritivo como forma de garantir maior segurança na utilização das informações do certificado, que está em fase de elaboração.

5. CONCLUSÕES

Neste estudo, foram concluídas todas as etapas para o preparo de um material de referência de mexilhão nacional, que já foi caracterizado quanto a propriedades físicas importantes tais como distribuição de tamanho de partículas e teor de umidade residual. A caracterização química do material de referência de mexilhão seguiu princípios internacionalmente aceitos para a avaliação da homogeneidade do material, bem como de sua estabilidade a curto e a longo prazo.

A aplicação de estatística robusta aos dados do programa colaborativo realizado possibilitou a definição de valores de consenso que, juntamente com as informações sobre incerteza de medição, levou à conclusão de que é viável a certificação da concentração de 11 elementos presentes no material de referência de mexilhão.

Ainda que não tenha sido possível certificar a concentração de elementos de grande importância tais como Cd, Hg e Pb, foi possível fazer a atribuição de valores certificados para Ca, Na, Se e Zn, elementos importantes do ponto de vista nutricional e de As, elemento de interesse devido à sua toxicidade.

Além do intercâmbio com pesquisadores de outros centros do IPEN - CNEN/SP e de outras instituições nacionais e internacionais, o desenvolvimento desse programa de doutorado possibilitou, até o presente momento, a publicação de quatro artigos científicos, apresentados no Apêndice M.

Esse projeto pode ser considerado passo importante no desenvolvimento metrológico do país, pois demonstra ser viável a produção e caracterização de materiais de referência biológicos e, em particular, de mexilhão, como ferramenta de garantia da qualidade para estudos ambientais realizados no Brasil.

APÊNDICE A – Carta convite para participação no programa colaborativo para caracterização do candidato a material de referência de mexilhão

Programa de comparação interlaboratorial para caracterização de candidato a material de referência de mexilhão

O Laboratório de Análise por Ativação Neutrônica do IPEN-CNEN/SP tem a satisfação de convidá-lo para participar da comparação interlaboratorial para a caracterização do candidato a material de referência certificado de mexilhão TM-1 – *Tecido de mexilhão*. O objetivo deste projeto é contribuir para a Metrologia em Química no Brasil, pela melhoria da qualidade e confiabilidade de resultados de medição em estudos ambientais e ligados à área de nutrição que venham a utilizar este material. O projeto conta com apoio da FAPESP e também está relacionado a um trabalho de doutorado que está sendo desenvolvido no IPEN-CNEN/SP.

O mexilhão utilizado neste projeto é da espécie *Perna perna*, abundante no litoral brasileiro e importante, tanto como fonte de alimento quanto devido a seu uso em estudos de monitoramento de poluição ambiental. O material foi adquirido de produtor de mexilhões da Praia da Cocanha em Caraguatatuba, estado de São Paulo, tendo sido processado seguindo-se as recomendações do ISO Guia 35 sobre o preparo de materiais de referência. O material foi liofilizado e o tamanho de grãos ajustado para menor que 105 µm. Após homogeneização, o material foi embalado em frascos com aproximadamente 13 g cada, sendo finalmente esterilizado com radiação gama.

Os elementos de interesse para a caracterização são: Ag, As, Br, Ca, Cl, Co, Cd, Cr, Cs, Fe, Hg, I, K, Mg, Na, Pb, Rb, Sb, Sc, Se, Sn, Th, U, V e Zn, que se apresentam em nível de concentração natural no material. No caso do Hg, além do Hg total, pretende-se determinar metil-Hg. A caracterização de outros analitos, tais como outras espécies orgânicas e radionuclídeos, também é bastante bem vinda.

Dois frascos do material serão enviados para cada participante, devendo ser armazenados sob refrigeração. Uma vez que o material é higroscópico, pede-se que seja feita a determinação de umidade residual do material. Uma alíquota independente de cada frasco deve ser seca em estufa a 85°C até massa constante. Pede-se que os participantes façam seis determinações independentes dos elementos em cada frasco, utilizando métodos a sua escolha. Além disso, determinações em três alíquotas de amostras de controle de qualidade (um material de referência certificado) devem ser fornecidas. Os participantes devem enviar os resultados em mg kg⁻¹, em massa seca, juntamente com descrição do método utilizado. Os resultados devem ser apresentados com o número de algarismos significativos apropriados para a exatidão do método. A descrição do método deve incluir: possíveis pré-tratamentos da amostra utilizados, tais como etapas de pré-concentração e de recuperação; a técnica analítica empregada e o limite de detecção, juntamente com a forma que este foi calculado. Uma descrição detalhada da avaliação das incertezas envolvidas na determinação dos analitos é muito bem vinda, mas não obrigatória. Neste caso, a incerteza

(U) expandida e o fator de abrangência (k) devem ser apresentados. Os resultados devem ser enviados até 15 de dezembro de 2008, utilizando-se as planilhas fornecidas.

Todos os resultados serão tratados de forma estritamente confidencial e um relatório com a avaliação do estudo será enviado a cada um dos participantes.

APÊNDICE B – Formulário para envio dos resultados do programa colaborativo para caracterização do candidato a material de referência de mexilhão

O arquivo eletrônico para o envio dos resultados consistiu de cinco planilhas. A primeira para a identificação do participante, a segunda e terceira para o envio dos dados obtidos para os frascos 1 e 2, a quarta para os dados obtidos para o material de controle e a última planilha para descrição livre do método analítico utilizado, conforme apresentado a seguir.

Planilha B1 Participante

Programa de comparação interlaboratorial para caracterização do candidato a material de referência TM-1 – Tecido de Mexilhão			
1- Dados do participante		Código:	(Deixar em branco)
Instituição			
Departamento:			
Laboratório:			
Endereço:			
Bairro:		Cidade:	
CEP:		País	
Responsável:			
Telefone:		FAX:	
e-mail:			

APÊNDICE C – Gráficos EDA obtidos para os resultados do estudo de homogeneidade entre frascos por INAA: a) gráfico sequencial dos resultados; b) gráfico da variação entre resultados adjacentes (*lag plot*); c) histograma e d) gráfico de probabilidade normal

As

Ag

APENDICE C - continuação

Br **Co** **Cr** **Cs**

APENDICE C - continuação

Eu **La** **Na** **Rb**

APENDICE C - continuação

Sc

Se

Th

Zn

APENDICE D – Teste de Shapiro-Wilk para normalidade a 95 % de confiança

TABELA D1 - Resultados do teste de homogeneidade entre frascos, obtidos por INAA

Elemento	Frasco	<i>n</i>	<i>W</i>	Valor de <i>p</i>	Decisão no nível 0,05
As	19	7	0,914	0,443	Normal
	40	8	0,979	0,953	Normal
	75	8	0,992	0,996	Normal
	112	8	0,930	0,526	Normal
	143	7	0,897	0,327	Normal
	156	7	0,906	0,385	Normal
Ag	19	8	0,947	0,684	Normal
	40	8	0,805	0,033	Não normal
	75	8	0,912	0,376	Normal
	112	8	0,859	0,120	Normal
	143	8	0,916	0,403	Normal
	156	7	0,918	0,481	Normal
Br	19	7	0,843	0,108	Normal
	40	8	0,941	0,622	Normal
	75	8	0,915	0,394	Normal
	112	8	0,960	0,802	Normal
	143	7	0,980	0,961	Normal
	156	8	0,964	0,846	Normal
Co	19	6	0,906	0,396	Normal
	40	8	0,943	0,647	Normal
	75	7	0,944	0,696	Normal
	112	8	0,968	0,883	Normal
	143	8	0,807	0,035	Não normal
	156	7	0,969	0,889	Normal
Cr	19	8	0,924	0,470	Normal
	40	7	0,949	0,732	Normal
	75	6	0,894	0,334	Normal
	112	8	0,914	0,388	Normal
	143	8	0,944	0,656	Normal
	156	8	0,936	0,577	Normal
Cs	19	8	0,957	0,768	Normal
	40	8	0,954	0,757	Normal
	75	8	0,929	0,508	Normal
	112	8	0,972	0,909	Normal
	143	8	0,909	0,356	Normal
	156	8	0,932	0,537	Normal
Eu	19	8	0,964	0,849	Normal
	40	8	0,885	0,213	Normal
	75	7	0,854	0,138	Normal
	112	8	0,966	0,862	Normal
	143	8	0,961	0,823	Normal
	156	8	0,952	0,733	Normal

TABELA D1 - Resultados do teste de homogeneidade entre frascos, obtidos por INAA - continuação

Elemento	Frasco	n	W	Valor de p	Decisão no nível 0,05
Fe	19	8	0,959	0,804	Normal
	40	8	0,899	0,287	Normal
	75	8	0,890	0,239	Normal
	112	8	0,952	0,731	Normal
	143	6	0,989	0,984	Normal
	156	8	0,918	0,424	Normal
La	19	7	0,980	0,958	Normal
	40	8	0,918	0,417	Normal
	75	8	0,941	0,627	Normal
	112	8	0,904	0,318	Normal
	143	7	0,938	0,637	Normal
	156	8	0,954	0,753	Normal
Na	19	7	0,936	0,619	Normal
	40	8	0,901	0,302	Normal
	75	8	0,932	0,541	Normal
	112	8	0,927	0,495	Normal
	143	7	0,969	0,896	Normal
	156	8	0,937	0,574	Normal
Rb	19	8	0,928	0,504	Normal
	40	8	0,986	0,983	Normal
	75	8	0,893	0,256	Normal
	112	8	0,955	0,758	Normal
	143	8	0,927	0,498	Normal
	156	8	0,822	0,051	Normal
Sc	19	7	0,954	0,781	Normal
	40	8	0,926	0,487	Normal
	75	5	0,832	0,143	Normal
	112	8	0,857	0,113	Normal
	143	8	0,835	0,069	Normal
	156	8	0,909	0,351	Normal
Se	19	8	0,919	0,416	Normal
	40	7	0,858	0,150	Normal
	75	8	0,917	0,414	Normal
	112	8	0,846	0,089	Normal
	143	8	0,973	0,919	Normal
	156	8	0,977	0,944	Normal
Th	19	8	0,931	0,530	Normal
	40	8	0,930	0,522	Normal
	75	8	0,943	0,646	Normal
	112	8	0,956	0,774	Normal
	143	8	0,958	0,790	Normal
	156	6	0,775	0,033	Não normal
Zn	19	8	0,977	0,945	Normal
	40	8	0,919	0,430	Normal
	75	8	0,885	0,215	Normal
	112	8	0,946	0,678	Normal
	143	8	0,920	0,435	Normal
	156	8	0,978	0,951	Normal

TABELA D2 - Resultados do teste de homogeneidade entre frascos, obtidos por k_0 -INAA

Elemento	Frasco	n	W	Valor de p	Decisão no nível 0,05
Al	11	6	0,969	0,885	Normal
	33	5	0,859	0,222	Normal
	161	6	0,782	0,039	Não normal
Br	11	6	0,955	0,792	Normal
	33	5	0,754	0,033	Não Normal
	161	6	0,818	0,078	Normal
Cl	11	6	0,866	0,207	Normal
	33	5	0,710	0,014	Não normal
	161	6	0,812	0,069	Normal
K	11	6	0,973	0,903	Normal
	33	5	0,991	0,973	Normal
	161	5	0,957	0,789	Normal
Mg	11	6	0,944	0,719	Normal
	33	5	0,976	0,903	Normal
	161	6	0,987	0,206	Normal
Mn	11	6	0,958	0,817	Normal
	33	4	0,862	0,265	Normal
	161	5	0,692	0,009	Não normal
Na	11	6	0,900	0,366	Normal
	33	4	0,854	0,234	Normal
	161	6	0,679	0,002	Não Normal
V	11	6	0,942	0,693	Normal
	33	5	0,917	0,513	Normal
	161	6	0,966	0,866	Normal

TABELA D3 - Resultados do teste de homogeneidade entre frascos, obtidos por AAS

Elemento	Frasco	n	W	Valor de p	Decisão no nível 0,05
Hg	19	8	0,939	0,604	Normal
	40	7	0,828	0,078	Normal
	75	7	0,928	0,555	Normal
	112	8	0,917	0,413	Normal
	143	7	0,985	0,977	Normal
	156	8	0,978	0,947	Normal
Cd	19	7	0,916	0,456	Normal
	40	7	0,941	0,665	Normal
	75	8	0,928	0,503	Normal
	112	8	0,954	0,756	Normal
	143	8	0,988	0,988	Normal
	156	7	0,818	0,062	Normal
Pb	19	8	0,892	0,252	Normal
	40	6	0,905	0,390	Normal
	75	8	0,891	0,241	Normal
	112	8	0,954	0,757	Normal
	143	8	0,949	0,703	Normal
	156	8	0,956	0,776	Normal

TABELA D4 - Resultados do teste de homogeneidade dentro do frasco, obtidos por INAA

Elemento	Massa, mg	<i>n</i>	<i>W</i>	Valor de <i>p</i>	Decisão no nível 0,05
Ag	50	8	0,892	0,249	Normal
	150	8	0,877	0,177	Normal
	250	8	0,863	0,130	Normal
	350	7	0,931	0,582	Normal
	500	7	0,948	0,7266	Normal
As	50	7	0,887	0,272	Normal
	150	8	0,951	0,724	Normal
	250	8	0,864	0,137	Normal
	350	6	0,939	0,665	Normal
	500	5	0,858	0,218	Normal
Br	50	8	0,507	0,00003	Não normal
	150	7	0,526	0,00004	Não normal
	250	8	0,575	0,00013	Não normal
	350	7	0,930	0,567	Normal
	500	7	0,959	0,819	Normal
Co	50	8	0,976	0,937	Normal
	150	8	0,914	0,388	Normal
	250	8	0,899	0,288	Normal
	350	7	0,936	0,618	Normal
	500	6	0,815	0,073	Normal
Cr	50	8	0,948	0,689	Normal
	150	8	0,853	0,105	Normal
	250	8	0,981	0,962	Normal
	350	7	0,927	0,548	Normal
	500	7	0,892	0,246	Normal
Cs	50	8	0,878	0,181	Normal
	150	8	0,961	0,816	Normal
	250	8	0,945	0,663	Normal
	350	7	0,955	0,784	Normal
	500	8	0,834	0,068	Normal
Eu	50	8	0,957	0,780	Normal
	150	8	0,980	0,957	Normal
	250	8	0,851	0,100	Normal
	350	7	0,929	0,563	Normal
	500	8	0,901	0,299	Normal
Fe	50	8	0,926	0,489	Normal
	150	8	0,979	0,956	Normal
	250	8	0,967	0,869	Normal
	350	7	0,953	0,767	Normal
	500	8	0,966	0,867	Normal
La	50	7	0,938	0,635	Normal
	150	8	0,911	0,364	Normal
	250	8	0,923	0,458	Normal
	350	5	0,733	0,022	Não normal
	500	7	0,901	0,351	Normal
Na	50	7	0,934	0,604	Normal
	150	8	0,937	0,587	Normal
	250	7	0,925	0,531	Normal
	350	6	0,984	0,964	Normal
	500	7	0,823	0,069	Normal

TABELA D4 - Resultados do teste de homogeneidade dentro do frasco, obtidos por INAA
- continuação

Elemento	Massa, mg	<i>n</i>	<i>W</i>	Valor de <i>p</i>	Decisão no nível 0,05
Rb	50	8	0,918	0,415	Normal
	150	6	0,721	0,010	Não Normal
	250	7	0,723	0,007	Não Normal
	350	7	0,887	0,269	Normal
	500	8	0,866	0,178	Normal
Sc	50	8	0,922	0,451	Normal
	150	8	0,881	0,195	Normal
	250	8	0,954	0,750	Normal
	350	7	0,814	0,05	Normal
	500	8	0,910	0,351	Normal
Se	50	8	0,946	0,678	Normal
	150	8	0,917	0,411	Normal
	250	8	0,969	0,886	Normal
	350	7	0,978	0,948	Normal
	500	8	0,915	0,393	Normal
Th	50	6	0,926	0,555	Normal
	150	7	0,875	0,212	Normal
	250	5	0,828	0,133	Normal
	350	6	0,875	0,244	Normal
	500	8	0,872	0,162	Normal
Zn	50	8	0,919	0,427	Normal
	150	8	0,919	0,429	Normal
	250	8	0,972	0,907	Normal
	350	6	0,888	0,302	Normal
	500	8	0,862	0,128	Normal

TABELA D5 – Resultado do teste de homogeneidade dentro do frasco, obtidos por AAS

Elemento	Massa, mg	<i>n</i>	<i>W</i>	Valor de <i>p</i>	Decisão no nível 0,05
Hg	50	7	0,936	0,617	Normal
	150	8	0,966	0,860	Normal
	250	8	0,927	0,495	Normal
	350	8	0,931	0,532	Normal
	500	7	0,948	0,727	Normal
Cd	50	7	0,936	0,859	Normal
	150	7	0,966	0,495	Normal
	250	8	0,927	0,532	Normal
	350	8	0,931	0,727	Normal
	500	8	0,948	0,617	Normal
PB	50	8	0,924	0,471	Normal
	150	8	0,948	0,691	Normal
	250	8	0,955	0,764	Normal
	350	8	0,915	0,395	Normal
	500	8	0,861	0,125	Normal

APENDICE E – Investigação de tendências no estudo de homogeneidade entre frascos:

a) resultados apresentados por ordem de medição com ajuste de curva linear; b) resultados apresentados por ordem de frasco com ajuste de curva linear

E1 – Resultados obtidos por INAA

APENDICE E1 - continuação

APENDICE E1 - continuação

APENDICE E1 - continuação

APENDICE E1 - continuação

APENDICE E1 - continuação

APENDICE E1 - continuação

APENDICE E1 - continuação

E2 – Resultados obtidos por k_0 -INAA

APENDICE E2 - continuação

APENDICE E2 - continuação

APENDICE E2 - continuação

E3 – Resultados obtidos por AAS

APÊNDICE F - Desvio padrão relativo em função da massa para o estudo de homogeneidade dentro do frasco por INAA. Estimativa do desvio padrão de repetitividade do método (-----)

APÊNDICE F – Resultados obtidos por INAA - continuação

APÊNDICE G - Investigação de tendência no estudo de estabilidade a curto prazo por INAA, com resultados apresentados por ordem de tempo e ajuste de curva linear

APENDICE G - continuação

APENDICE G -continuação

APENDICE G -continuação

APÊNDICE H - Razões Q_T para os estudos de estabilidade

H1 – Resultados para estabilidade a curto prazo por INAA

APÊNDICE H1 - continuação

H2 – Resultados para estabilidade a longo prazo por INAA

APÊNDICE H2 - continuação

APÊNDICE I – Investigação de tendências no estudo de estabilidade a longo prazo:

a) resultados apresentados por ordem de medição com ajuste de curva linear; b) resultados apresentados por ordem de tempo com ajuste de curva linear

I1 – Resultados obtidos por INAA

APÊNDICE II - continuação

APÊNDICE II - continuação

APÊNDICE II - continuação

APÊNDICE II - continuação

APÊNDICE II - continuação

APÊNDICE II - continuação

APÊNDICE II - continuação

I2 – Resultados obtidos por AAS

APÊNDICE J – Gráficos de Youden para os resultados do programa colaborativo. Médias robustas H15(—)

APÊNDICE J - continuação

APÊNDICE J - continuação

APÊNDICE J - continuação

APÊNDICE J - continuação

APÊNDICE J - continuação

APÊNDICE K - Média e intervalo de confiança em base seca (frascos A e B), ordenados por ordem de concentração, para os resultados reportados pelos participantes do programa colaborativo para caracterização do candidato a MRC. Média robusta H15 (———), Incerteza expandida de caracterização, $k = 2$ (-----)

APÊNDICE K - continuação

APÊNDICE K - continuação

APÊNDICE K - continuação

APÊNDICE K - continuação

APÊNDICE K - continuação

APÊNDICE K - continuação

APÊNDICE K - continuação

APÊNDICE K - continuação

APÊNDICE K - continuação

APÊNDICE K - continuação

APÊNDICE L - Contribuições da incerteza de caracterização, u_{car} , da incerteza devida à homogeneidade, u_{bb} e da incerteza devida à estabilidade a longo prazo, u_{lts} , para as incertezas padrão combinadas associadas aos valores de concentração, u_{MRC} , no candidato a MR de mexilhão

APÊNDICE L - continuação

APÊNDICE L - continuação

APÊNDICE L - continuação

APÊNDICE M – Artigos publicados

Neste apêndice são apresentados os artigos relacionados ao projeto de preparo e caracterização do material de referência de mexilhão que foram publicados até o momento do término desta tese:

MOREIRA, E. G.; VASCONCELLOS, M. B. A.; MAIHARA, V. A.; CATHARINO, M. G. M.; SAIKI, M. Mussel reference material preparation proposal as a quality assurance tool for Brazilian seashore biomonitoring. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.** v. 2, n. 1, p. 61-65, 2007.

MOREIRA, E. G.; VASCONCELLOS, M. B. A.; CATHARINO, M. G. M.; MAIHARA, V. A.; SAIKI, M. *Perna perna* mussel reference material: short term stability assessment. **J. Radioanal. Nucl. Chem.** v. 282, p. 957-962, 2009.

MOREIRA, E. G.; VASCONCELLOS, M. B. A.; CATHARINO, M. G. M.; MAIHARA, V. A.; SAIKI, M. Application of INAA complementary gamma ray photopeaks to the homogeneity study of a mussel candidate reference material. **J. Radioanal. Nucl. Chem.** v. 283, n. 3, p. 819-822, 2010.

MOREIRA, E. G.; VASCONCELLOS, M. B. A.; CATHARINO, M. G. M.; MAIHARA, V. A.; SAIKI, M. Long term stability on a *Perna perna* mussel candidate reference material. **Accred. Qual. Assur.** v. 15, n. 4, p. 233-238, 2010.

Mussel Reference Material Preparation Proposal as a Quality Assurance Tool for Brazilian Seashore Biomonitoring

E. G. MOREIRA,* M. B. A. VASCONCELLOS, V. A. MAIHARA, M. G. M. CATHARINO & M. SAIKI

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP,
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, CEP 05346-000, Butantã, São Paulo, SP, Brasil

(Received July 6, 2006; Accepted November 29, 2006)

ABSTRACT

Analytical measurement results may affect economical, political and environmental protection decisions. Therefore, there is a growing demand for quality assurance of such results. The use of certified reference materials, CRMs, is a simple and efficient way to validate analytical methods and to keep them under control. However, CRMs are expensive and usually obtained abroad, which makes their use prohibitive for a large number of Brazilian chemical laboratories. This paper presents a proposal for the preparation of a mussel reference material using the *Perna perna* species. This material will be used in biomonitoring studies of the Brazilian Seashore. The various aspects of the preparation such as sampling, processing, physical and chemical characterization are presented. Preliminary results for the concentration of elements such as As, Br, Co, Cr, Fe, K, Na, Se and Zn determined by INAA and Cd and Hg determined by AAS, are also presented.

Key words: reference material, mussel, *Perna perna*, INAA, AAS, metals.

RESUMO

Proposta de preparo de um material de referência de mexilhão como ferramenta de controle de qualidade para a biomonitoração do litoral brasileiro

Resultados de medições analíticas podem afetar decisões econômicas, políticas e de preservação ambiental. Assim, há crescente demanda para a garantia da qualidade de tais resultados. A utilização de materiais de referência certificados, MRCs, é uma maneira simples e eficiente de validar métodos analíticos e monitorá-los de forma a garantir que estejam sob controle. No entanto, MRCs são materiais de alto valor agregado, em geral obtidos no exterior, o que torna seu uso rotineiro proibitivo para grande parte dos laboratórios nacionais. Neste trabalho é apresentada proposta de preparo de material de referência de mexilhão da espécie *Perna perna* para ser utilizado em estudos de biomonitoração de elementos tóxicos realizados em pontos do litoral brasileiro. Os diversos aspectos do preparo, como amostragem, processamento, caracterização física e química do material, serão abordados. Além disso, são apresentados resultados preliminares para a concentração de elementos como As, Br, Co, Cr, Fe, K, Na, Se e Zn, determinados por INAA, e Cd e Hg, determinados por AAS.

Palavras-chave: material de referência, mexilhão, *Perna perna*, INAA, metais.

INTRODUCTION

Reference materials in the quality assurance of analytical measurements

Analytical measurement results may affect economical, political and environmental protection decisions regarding pollutant limits implementation in environment monitoring and in remediation planning (Zschunke, 2000). Therefore, there

has been a growing demand for quality assurance of such results, i.e., that obtained results are accurate through analytical techniques and that they are accompanied by their respective associated uncertainties in order to warrant the confiability for result comparison between different locations and different times. A straightforward and efficient method to achieve this goal is the comparison of the result obtained for a real sample with the value assigned to a known material, the reference

*Corresponding author: Edson Gonçalves Moreira, e-mail: emoreira@ipen.br.

material, RM, which has sufficiently homogeneous and well-established property values. RMs are also used in the validation of analytical methods, inter-laboratory studies and proficiency tests (Kramer *et al.*, 2001). When the property values of the RM are certified by a procedure that establishes the traceability of the values to an exact value of the unit of the International System of Units, SI, in which the property values are expressed, followed by an uncertainty for an established confidence level, the RM is called certified reference material, CRM. In the case of CRM for chemical composition, the property value is the element or compound concentration in the material (ISO, 1997).

Despite its importance in analytical result quality assurance, the use of CRMs is far from being widely disseminated. The complexity in the preparation and characterization of CRMs make their final price high, which may make their use economically unviable. Besides, there may be import constraints and restrictions for such materials. Last but not least, it is not always possible to obtain a CRM with a similar matrix to the sample under investigation and/or with element levels at the same range of concentration.

Use of mussels as biomonitors

Mussels are sedentary organisms that feed by seawater filtration and are in close contact with seawater. As a consequence, they may bioaccumulate several pollutants in their tissues. Although it may be detrimental to aquaculture, this fact has been extensively used in water quality monitoring.

Generally speaking, the objective of environmental monitoring is not only to determine the natural concentration of chemical constituents but also the concentration above which chemicals become pollutants in the environment. Many human activities such as mining, fossil fuel burning, industrial processing, agriculture, domestic sewage discharges and nuclear activities contribute to the pollution of the marine environment. Many contaminants pose drastic effects due to their bioavailability and toxicity to biological processes and persistence in the environment (Kayasth & Swain, 2004; Krammer *et al.*, 2001).

National and international environmental monitoring programs have been launched worldwide to assess the quality of aquatic environments. Even though it can be done using seawater, the use of marine organisms permits pollution evaluation over longer periods of time including concentration peaks and biological absorption effects. In this kind of study, marine organisms act as "biological samplers".

Mussels, oysters and other benthic organisms are used in marine and fresh water biomonitoring in more than seventy

countries (Krammer *et al.*, 2001). It is of fundamental importance that biomonitoring data are produced with sufficient accuracy if results obtained in different laboratories over long periods of time are to be compared. For the assessment of pollutants and their byproducts in the environment, it is important not only to use accurate techniques but also pay careful attention to every step of the analytical process from meaningful sampling and appropriate sample preparation and storage to the use of quality assurance and quality control protocols for analytical procedures. The availability of CRMs with similar properties as those of the real environmental samples is of utmost importance for the quality assurance and quality control of the analytical methods used in biomonitoring.

Various studies have been done in Brazil using marine organisms as indicators of anthropic toxic compound contamination of the environment (Callil, 1998; Medeiros *et al.*, 1998).¹ Nowadays, there is a biomonitoring study under development at IPEN in collaboration with the Oceanographic Institute of the São Paulo University. This study, subject of a Ph. D. program, aims the biomonitoring at some regions of São Paulo State Seashore for the contamination of toxic elements such as arsenic, cadmium, lead and mercury, using the *Perna perna* mussel.

Mussel reference material preparation proposal

From the previous observations, the relevance of the preparation of a mussel CRM, to help in the biomonitoring of seawater pollution, is evident. The development of skills for the preparation and certification of a mussel RM, i.e., a biological matrix reference material to be used in environmental studies, is an important step in Brazilian metrological evolution. In this paper, the preparation of a *Perna perna* mussel RM is proposed. The material will be used in toxic element biomonitoring studies of the Brazilian Seashore.

MATERIAL AND METHODS

In this work, the steps for the production of a mussel reference material are shown in Figure 1. The various steps were defined from the expertise of our laboratory in handling and sampling of biological materials, from the evaluation of detailed international mussel CRMs production reports, and they attend to international guidelines for the preparation, characterization and certification of CRMs (ISO, 1992, 1997, 2000a, 2000b, 2000c, 2006).

1. CALLIL, C. T., 1998, Utilização de moluscos como indicadores de mercúrio: proposta de biomonitoração. In: Encontro Brasileiro de Ecotoxicologia, 5., 05-08 out., Itajaí, SC. *Anais...* Itajaí. CD-ROM.

MEDEIROS, I. D., ALMEIDA, E. A., VENTURA, E. C., MÜLLER, I. C., MEZZARI, M. P. & BAINY, A. C. D., 1998, Biomonitoramento da contaminação aquática na Baía Norte da Ilha de Santa Catarina utilizando mexilhões *Perna perna* como organismos sentinela. In: Encontro Brasileiro de Ecotoxicologia, 5., 05-08 out., Itajaí, SC. *Anais...* Itajaí. CD-ROM.

Mussels were obtained from a single population, from a single producer, from Cocanha Beach in Caraguatatuba City, São Paulo State North Shore, where mussels are cultivated by the longline system. Using cultivated mussels poses the advantage of using animals with the same size (age), at the same place and the same time of origin (same pollution burden history), which enhances the homogeneity of the product. Furthermore, sampling is easy and usually at a reasonably low cost.

Tissue masses shown in Figure 1 are approximate and were obtained from preliminary tests. An 80% mass loss in the freeze drying process and in the disposal of individuals with size outside the range of the mean size of the population used was considered. A 20% dry material loss was also foreseen due to storage, drying, vessel transfers and inappropriate particle size fractions disposal after cryomilling in a ball mill.

After the bulk preparation, the candidate RM will be homogenized in an appropriate "Y shape" mixer and bottled in glass bottles with about 20 g of RM each. The moisture content

of the material will be tested in a moisture content determination balance and, if necessary, the RM will be subjected to the freeze-drying process until the moisture content level be lower than 3-4% (w/w). The bottles will be gamma ray irradiated at the ^{60}Co irradiation facility at IPEN in order to enhance its stability. The homogeneity will be evaluated with respect to the within-bottle homogeneity and between-bottles homogeneity by means of a two-way analysis of variance test, ANOVA (ISO, 2006). The stability of the material will be checked at different temperatures using a previously established experimental design to define the most favorable transport and storage conditions (ISO, 2006). The content of the elements of interest in the candidate RM will be determined by national and international laboratories in an interlaboratorial program by means of various validated analytical methodologies. Element content certification will be accomplished by applying statistical treatments to the results reported by the interlaboratory program participants in order to assign the certified values and their associated uncertainties.

Figure 1 – Preparation steps for the mussel reference material.

Table 1 – Element concentration determined in this study by INAA, CV-AAS (Hg) and ETAAS (Cd) for a test sample of the mussel candidate CRM and certified values for mussel CRMs.^a

Element	Candidate CRM	IRMM CE 278	NIST SRM 2976
As, mg kg ⁻¹	15.8 ± 0.5	6.07 ± 0.13	13.3 ± 1.8
Br, mg kg ⁻¹	338 ± 5	NC	(329 ± 15)
Cd, mg kg ⁻¹	0.654 ± 0.013	0.348 ± 0.007	0.82 ± 0.16
Co, mg kg ⁻¹	0.86 ± 0.01	NC	(0.61 ± 0.02)
Cr, mg kg ⁻¹	0.90 ± 0.06	0.78 ± 0.06	NC
Fe, mg kg ⁻¹	373 ± 6	NC	171.0 ± 4.9
Hg, mg kg ⁻¹	0.188 ± 0.020	0.196 ± 0.009	0.0610 ± 0.0036
K, %	1.3 ± 0.2	NC	(0.76 ± 0.03)
Na, %	2.79 ± 0.01	NC	(3.5 ± 0.1)
Se, mg kg ⁻¹	3.6 ± 0.2	1.84 ± 0.10	1.80 ± 0.15
Zn, mg kg ⁻¹	103 ± 1	83.1 ± 1.7	137 ± 13

NC – not certified; concentrations in parentheses are informative values (not certified); ^auncertainties are: the standard deviation for three determinations (candidate CRM); 95% confidence intervals (IRMM CE 278); expanded uncertainties (NIST SRM 2976).

RESULTS

At the time being, the material is in the freeze-drying step. Mean water content is about 84%. Preliminary element concentration results in test samples of the mussel candidate reference material are shown in Table 1. As, Br, Co, Cr, Fe, K, Na, Se and Zn were analyzed by Instrumental Neutron Activation Analysis, INAA; Hg by Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry, CVAAS and Cd by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry, ETAAS. For comparison purposes, the certified values for two CRMs are also presented: IRMM CE 278 “mussel tissue” and NIST SRM 2976 “mussel tissue (trace elements and methylmercury)” (IRMM, 2004; NIST, 1998).

Most element concentration values in the candidate RM are at the same order of magnitude of the certified values for IRMM CE 278, which was produced from the tissue of the *Mytilus edulis* mussel collected in the Dutch Wadden Sea and for NIST SRM 2976, which was produced from the tissue of the *Mytilus galloprovincialis* mussel obtained from French commercial producers close to Marseille. Important exceptions are As and Hg. As is present in higher amounts in the candidate RM than in IRMM CE 278. In contrast, Hg is present in the same order of magnitude in IRMM CE 278 but in considerably lower levels in NIST SRM 2976. Such differences are observable in matrix reference materials and reflect differences in water quality, species used in the CRM preparation and the degree of development of the used animals.

DISCUSSION

The preliminary results presented in this paper show the viability of the production of a Brazilian mussel certified reference material, which is contribution to Brazilian Metrology as it may be used in the quality assurance of analytical results and hence, they improve the confidence in the data used in biomonitoring as well as in ecotoxicological studies concerned with toxic element determination. It is also important to stress that the certification of the candidate reference material will be possible with the collaboration of other laboratories, as concentration values are usually assessed as the consensus mean among result values obtained in interlaboratory trials.

Acknowledgements — We are indebted to the Brazilian government agencies FAPESP and CNPq for financial support in the preparation of this work.

REFERENCES

- IRMM, INSTITUTE FOR REFERENCE MATERIALS AND MEASUREMENT, 2004, *The certification of the mass fraction of As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Pb, Se and Zn in mussel tissue (Mytilus edulis) – Certified Reference Material ERM-CE278*. European Commission, Geel, Belgium, 20p.
- ISO, INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 1992, *Terms and definitions related to reference materials (ISO Guide 30)*. 2 ed. Genève, Switzerland, 9p.
- ISO, INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 1997, *Calibration in analytical chemistry and use of certified reference materials (ISO Guide 32)*. 1 ed. Genève, Switzerland, 9p.

- ISO, INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2000a, *Reference materials – Contents of certificates and labels (ISO Guide 31)*. 2 ed. Genève, Switzerland, 8p.
- ISO, INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2000b, *Use of certified reference materials (ISO Guide 33)*. 2 ed. Genève, Switzerland, 23p.
- ISO, INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2000c, *General requirements for the competence of reference materials producers (ISO Guide 34)*. 2 ed. Genève, Switzerland, 22p.
- ISO, INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2006, *Reference materials – General and statistical principles for certification (ISO Guide 35)*. 3. ed. Genève, Switzerland, 64p.
- KAYASTH, S. & SWAIN, K. R., 2004, Role of analytical chemistry in environmental monitoring. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 262: 35-42.
- KRAMER, J. M., KRAMER, G. N. & MUNTAU, H., 2001, *Practical manual for the production of laboratory reference materials*, Mermayde, Bergen, Netherlands, 116p.
- NIST, NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS & TECHNOLOGY, 1998, *Standard Reference Material 2976 Certificate of Analysis – Mussel tissue (trace elements and methylmercury)*. Gaithersburg, USA, 8p.
- ZSCHUNKE, A. (ed.), 2000, *Reference materials in analytical chemistry – a guide for selection and use*. Springer, Berlin, Germany, 224p.

Perna perna mussel reference material: short term stability assessment

E. G. Moreira · M. B. A. Vasconcellos ·
 M. G. M. Catharino · V. A. Maihara ·
 M. Saiki

Received: 28 June 2009 / Published online: 16 July 2009
 © Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary 2009

Abstract Instrumental neutron activation analysis was used at a 2-month long isochronous short term stability test performed on a *Perna perna* mussel candidate reference material. The assessment of the analysis of variance test, as well as, the normalized results to the control temperature showed no systematic changes in the concentration of Ag, As, Br, Co, Cr, Cs, Fe, Eu, La, Na, Rb, Se, Sc, Th and Zn during the test period. The result showed that the candidate reference material may be transported under normal transport conditions without significant changes in composition for the determined elements.

Keywords Reference material · Mussel · *Perna perna* · INAA · Stability test

Introduction

Due to their intimate contact with sea water, mussels may accumulate toxic trace elements which are a concern from a nutritional point of view. However, mussels are resistant to deleterious effects, remaining alive. This fact is used in water quality monitoring studies, as toxic elements bioaccumulate in the tissues of the animals [1]. To improve the confidence on biomonitoring measurement results and to make it possible to compare results from different places in

time, various quality assurance procedures such as the use of certified reference materials are needed [2].

The short term stability study, one of the steps in the characterization of new reference materials, is used to verify if normal transport conditions will modify the status of the property values of interest [3]. Temperature variation is a key factor in biological material degradation and hence vials of the material are kept at different temperatures and analyzed as a function of time to check for possible property value variations. In this study a new Brazilian mussel candidate reference material was submitted to an isochronous short term stability test after bottling and gamma ray sterilization. In the isochronous design, element determination is performed only after all samples are submitted to the various temperatures and time periods of the test. In this case, the measurements may be accomplished in a situation closer to repeatability conditions than in a traditional design, resulting in more precise conclusions from the measurements [4].

Vials of the material were taken for testing for various time periods up to two months, at several temperatures (−20, 20, 40, and 60 °C). After the test periods, Ag, As, Br, Co, Cr, Cs, Fe, Eu, La, Na, Rb, Se, Sc, Th and Zn were determined by instrumental neutron activation analysis, INAA. To verify if the material may be transported under normal conditions, a comparison of element concentration for the various temperatures to the ones obtained at the control temperature (−20 °C) was performed. The lowest temperature was taken as the control temperature for the test, as it is considered that biological reference materials are stable for element content at this temperature. An analysis of variance, ANOVA, approach was performed for testing for each element, taking into account the variability within each vial (four replicates) and between vials.

E. G. Moreira (✉) · M. B. A. Vasconcellos ·
 M. G. M. Catharino · V. A. Maihara · M. Saiki
 Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares,
 IPEN – CNEN/SP, Av. Prof. Lineu Prestes, 2242,
 São Paulo, SP 05508-000, Brazil
 e-mail: emoreira@ipen.br

To supplement the ANOVA test, the mean results for the various temperatures were normalized for every element to the results obtained at the control temperature ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), according to Eq. 1.

$$R_T = \frac{X_T}{X_{-20\text{ }^{\circ}\text{C}}} \quad (1)$$

In the case of stability, the ratio R_T should be equal to 1, considered the uncertainty of the measurements which may be estimated from the coefficient of variation, CV, of the measurements obtained at each temperature [5], as given by Eq. 2.

$$U_T = \frac{\sqrt{(CV_T^2 + CV_{-20\text{ }^{\circ}\text{C}}^2) \times R_T}}{100} \quad (2)$$

It should be noted that as the different measurements were performed under the same conditions, Type B uncertainty contributions from X_T and $X_{-20\text{ }^{\circ}\text{C}}$ cancel in an estimation of the uncertainty in R_T and only the Type A contributions will remain (basically the repeatability of the two measurements).

Experimental

Isochronous layout

The preparation of the candidate reference material was described elsewhere [6]. Figure 1 presents the 2-month long isochronous design used in this study. Shadowed spaces represent the testing period for each X vial at the various temperatures until time 0, i.e., the time for analyses. A stratified random scheme was used for selection of the thirteen vials used. Vials were kept at $-20 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Continental FC 26 Freezer); $20 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ (climatized room); $40 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Fanem 315 SE oven) and $60 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Fanem Orion 515C oven) for periods that varied from 0.5 to

2.0 months. After the test periods all vials were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ till analysis.

Samples and elemental standard preparation

About 0.150 g of samples was weighed in properly cleaned polyethylene bags using a Shimadzu AEM-5200 analytical balance. Elemental standards were prepared by pipetting Spex standard element solutions onto Whatman paper filters, using variable volume pipettes (Eppendorf or Jencons). For some elements, the original solution was diluted in volumetric flasks prior to pipetting. After drying, paper filters were kept in polyethylene vials with the same geometry as for the samples. Four sample aliquots were taken from each vial for analysis.

Irradiation and element determination

After the test periods, sample aliquots and elemental standards were irradiated simultaneously for 8 h at $10^{12}\text{ n cm}^{-2}\text{ s}^{-1}$ thermal neutron flux of the IEA-R1 Nuclear Research Reactor at IPEN-CNEN/SP. ^{76}As , ^{82}Br , ^{140}La and ^{24}Na radionuclides were measured for 1.5 h, after a 7-day decay period, while $^{110\text{m}}\text{Ag}$, ^{60}Co , ^{51}Cr , ^{134}Cs , ^{59}Fe , ^{152}Eu , ^{86}Rb , ^{75}Se , ^{46}Sc , ^{233}Pa (for Th) and ^{65}Zn radionuclides were measured for 10 h, after a 15-day decay period. Gamma ray measurements were performed using a Canberra GC2018 HP Ge detector coupled to a Canberra DSA-1000 multichannel analyzer. Gamma ray spectra were collected and processed using a Canberra Genie 2000 version 3.1 spectroscopy software. Element content calculations were carried out using a Microsoft Excel spreadsheet. Sample aliquots were irradiated and measured in random in order to avoid interferences from any possible trends that might arise in the results during the measurement campaign.

Fig. 1 Isochronous design for the short term stability test

Temperature / time	2.0 months	1.5 months	1.0 month	0.5 month	0 month
$-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	X				
$20\text{ }^{\circ}\text{C}$	X				
		X			
			X		
				X	
$40\text{ }^{\circ}\text{C}$	X				
		X			
			X		
				X	
$60\text{ }^{\circ}\text{C}$	X				
		X			
			X		
				X	

Results and discussion

Table 1 presents the INAA measurement results obtained for the mussel candidate reference material vials submitted to the various temperatures and time periods of the short term stability test. The results are presented on a wet mass basis, as no correction for residual moisture was performed. Table 2 summarizes the ANOVA test output obtained for the mean concentration of four replicates for the thirteen vials for each element. The null hypothesis of the ANOVA test, H_0 , is that there is no difference among the mean concentration of the vials. If F , the calculated statistic of the test, is lower than the critical F_c value, there is no evidence to reject H_0 . Hence, the reference material may be considered stable for the test conditions. As a general trend, it was observed that the within vial variability (represented

by its mean square, MS) was greater or the same order of magnitude than the between vials variability. This was an indication that the observed variability is due to the precision of the INAA method used rather than to any significant differences among the vials. Except for Se, $F < F_c$ at the 95% confidence level for all the elements, indicating that there was no significant differences among the mean concentrations obtained for the vials, regardless of the period and temperature at which the vials were kept. In the case of Se, if a 99% confidence level is considered, the results may be considered equal, as at this less restrictive level $F < F_c$ ($F_c = 2.678$). These findings are corroborated by the obtained p-values which, with the exception of Se, were all greater than the level of significance $\alpha = 0.05$.

Table 3 presents the normalized results of the short term stability test as defined in the introduction above. Apart

Table 1 Element concentration in mg kg^{-1} obtained by INAA for the short term stability test (wet mass basis)

Vial	Temp. (°C)	Time, month	Ag	As	Br	Co	Cr	Cs	Eu	Fe
104	-20	2.0	2.36 ± 0.21	17.2 ± 4.5	206 ± 9	0.845 ± 0.059	1.09 ± 0.18	0.106 ± 0.019	0.0522 ± 0.0060	603 ± 49
150	20	0.5	2.33 ± 0.16	17.8 ± 4.6	219 ± 27	0.852 ± 0.029	1.24 ± 0.15	0.109 ± 0.011	0.0533 ± 0.0075	617 ± 37
123	20	1.0	2.32 ± 0.12	14.2 ± 2.8	199 ± 19	0.855 ± 0.042	1.26 ± 0.12	0.108 ± 0.013	0.0520 ± 0.0064	606 ± 28
81	20	1.5	2.36 ± 0.13	14.7 ± 2.1	218 ± 21	0.878 ± 0.052	1.17 ± 0.19	0.109 ± 0.012	0.0522 ± 0.0042	597 ± 31
13	20	2.0	2.37 ± 0.15	16.8 ± 2.4	205 ± 31	0.839 ± 0.112	1.17 ± 0.11	0.103 ± 0.015	0.0517 ± 0.0039	586 ± 24
166	40	0.5	2.34 ± 0.25	16.9 ± 4.1	218 ± 16	0.849 ± 0.030	1.13 ± 0.17	0.108 ± 0.017	0.0510 ± 0.0043	598 ± 58
111	40	1.0	2.44 ± 0.29	16.6 ± 5.4	216 ± 27	0.877 ± 0.056	1.18 ± 0.12	0.109 ± 0.011	0.0530 ± 0.0038	613 ± 10
51	40	1.5	2.36 ± 0.09	14.2 ± 1.8	208 ± 17	0.826 ± 0.008	1.14 ± 0.07	0.112 ± 0.006	0.0535 ± 0.0044	586 ± 41
7	40	2.0	2.23 ± 0.10	16.4 ± 3.9	209 ± 25	0.817 ± 0.018	1.07 ± 0.14	0.106 ± 0.015	0.0527 ± 0.0040	602 ± 18
170	60	0.5	2.41 ± 0.36	14.5 ± 1.3	198 ± 4	0.866 ± 0.053	1.16 ± 0.26	0.110 ± 0.016	0.0519 ± 0.0064	607 ± 21
86	60	1.0	2.32 ± 0.30	15.9 ± 5.0	219 ± 19	0.860 ± 0.038	1.18 ± 0.17	0.112 ± 0.006	0.0525 ± 0.0045	599 ± 39
65	60	1.5	2.41 ± 0.05	17.1 ± 5.7	216 ± 33	0.879 ± 0.077	1.17 ± 0.13	0.110 ± 0.008	0.0537 ± 0.0064	608 ± 14
15	60	2.0	2.34 ± 0.27	15.6 ± 4.3	218 ± 15	0.862 ± 0.091	1.23 ± 0.17	0.104 ± 0.010	0.0555 ± 0.0034	599 ± 18
Vial	Temp. (°C)	Time, month	La	Na (%)	Rb	Sc	Se	Th	Zn	
104	-20	2.0	0.73 ± 0.06	1.92 ± 0.09	4.50 ± 0.61	0.191 ± 0.012	4.43 ± 0.33	0.263 ± 0.027	118.2 ± 7.3	
150	20	0.5	0.78 ± 0.10	1.99 ± 0.11	4.46 ± 0.69	0.187 ± 0.006	4.35 ± 0.18	0.260 ± 0.025	117.4 ± 10.4	
123	20	1.0	0.69 ± 0.08	1.82 ± 0.14	4.64 ± 0.49	0.188 ± 0.013	4.56 ± 0.10	0.250 ± 0.017	116.2 ± 5.4	
81	20	1.5	0.70 ± 0.17	2.03 ± 0.19	4.74 ± 0.82	0.193 ± 0.010	4.59 ± 0.32	0.262 ± 0.027	116.4 ± 2.2	
13	20	2.0	0.77 ± 0.18	1.86 ± 0.52	4.29 ± 0.65	0.191 ± 0.011	4.47 ± 0.29	0.277 ± 0.069	112.9 ± 8.4	
166	40	0.5	0.73 ± 0.03	1.95 ± 0.15	4.53 ± 0.45	0.189 ± 0.006	4.43 ± 0.24	0.251 ± 0.011	115.3 ± 11.1	
111	40	1.0	0.70 ± 0.17	1.97 ± 0.39	4.76 ± 0.36	0.195 ± 0.015	4.42 ± 0.19	0.271 ± 0.019	119.9 ± 1.5	
51	40	1.5	0.74 ± 0.04	1.91 ± 0.24	4.73 ± 0.51	0.188 ± 0.007	4.29 ± 0.34	0.254 ± 0.022	114.4 ± 9.4	
7	40	2.0	0.72 ± 0.09	1.92 ± 0.18	4.27 ± 0.39	0.182 ± 0.011	4.14 ± 0.15	0.240 ± 0.022	115.3 ± 8.0	
170	60	0.5	0.68 ± 0.13	1.88 ± 0.10	4.65 ± 0.74	0.195 ± 0.012	4.40 ± 0.22	0.267 ± 0.027	119.7 ± 8.1	
86	60	1.0	0.71 ± 0.14	1.94 ± 0.11	4.65 ± 0.55	0.188 ± 0.018	4.45 ± 0.14	0.251 ± 0.027	115.4 ± 7.4	
65	60	1.5	0.76 ± 0.20	1.95 ± 0.26	4.91 ± 0.60	0.197 ± 0.010	4.54 ± 0.40	0.270 ± 0.021	117.0 ± 3.7	
15	60	2.0	0.75 ± 0.13	2.03 ± 0.25	4.54 ± 0.47	0.198 ± 0.027	4.30 ± 0.28	0.265 ± 0.057	117.6 ± 4.2	

Mean result and confidence interval at 95% confidence level for $n = 4$

Table 2 ANOVA table for the short term stability test

Element	Variation source	MS	<i>F</i>	<i>p</i> -value	F_c^a
Ag	Between	0.0105	0.586	0.840	2.010
	Within	0.0179			
As	Between	6.113	1.000	0.467	2.010
	Within	6.110			
Br	Between	236	1.249	0.287	2.010
	Within	189			
Co	Between	0.00151	1.128	0.366	2.010
	Within	0.00134			
Cr	Between	0.0123	1.175	0.334	2.010
	Within	0.0105			
Cs	Between	0.0000298	0.459	0.927	2.010
	Within	0.0000649			
Eu	Between	0.00000662	0.620	0.812	2.010
	Within	0.00001068			
Fe	Between	340	0.749	0.696	2.010
	Within	454			
La	Between	0.00395	0.611	0.820	2.010
	Within	0.00647			
Na	Between	0.0212	0.537	0.877	2.010
	Within	0.0395			
Rb	Between	0.136	1.032	0.440	2.010
	Within	0.132			
Sc	Between	0.0000787	1.120	0.373	2.010
	Within	0.0000703			
Se	Between	0.0615	2.312	0.024	2.010
	Within	0.0266			
Th	Between	0.000443	1.073	0.408	2.010
	Within	0.000413			
Zn	Between	16.2	0.768	0.678	2.010
	Within	21.1			

^a F_c for $\alpha = 0.05$; $\nu_1 = 12$;
 $\nu_2 = 39$

from As (at 60 °C and 0.5 month exposure period) and Cr (at 20 °C and 1.0 month exposure period), the obtained ratios 1 are comprised between the respective $R_T - U_T$ and $R_T + U_T$ ranges, and hence, no instability can be concluded. The observed variations for As and Cr seem to be more related to a possible lack of precision of the method than to any noticeable degradation of the material. As an illustration, Fig. 2 shows the R_T values for selected elements (uncertainties are not shown for clarity). The results obtained for Ag and Fe is the pattern for most elements. Even though Se failed the ANOVA test at 95% confidence level, no significant degradation was observed from its plot. The plot for As shows that this element was the most adverse where stability is concerned. Even though As may be unstable in reference material due to degradation or losses of its organic species [7], the pattern of the graph,

including the behavior for the vials kept at 60 °C led the authors to the conclusion that the observed variations are related to poor precision and not to any degradation during the test period.

Conclusion

With the application of the INAA method to the isochronous short time stability test it was possible to confirm that there was no systematic changes in concentration for 15 elements during the time period of this study. It was concluded that the candidate mussel reference material is stable enough to be transported under normal transport conditions without any significant changes in composition for the determined elements.

Table 3 Normalized results of the short term stability test obtained by INAA

Element	Temperature (°C)	$R_T \pm U_T$			
		0.5 month	1.0 month	1.5 months	2.0 months
Ag	20	0.991 ± 0.070	0.985 ± 0.064	1.002 ± 0.061	1.004 ± 0.070
	40	0.991 ± 0.087	1.034 ± 0.095	0.999 ± 0.061	0.946 ± 0.059
	60	1.024 ± 0.111	0.986 ± 0.098	1.021 ± 0.058	0.992 ± 0.092
As	20	1.03 ± 0.24	0.82 ± 0.17	0.85 ± 0.16	0.97 ± 0.18
	40	0.98 ± 0.22	0.96 ± 0.25	0.83 ± 0.15	0.95 ± 0.21
	60	0.84 ± 0.15	0.92 ± 0.24	0.99 ± 0.26	0.90 ± 0.22
Br	20	1.059 ± 0.087	0.964 ± 0.065	1.057 ± 0.071	0.992 ± 0.099
	40	1.053 ± 0.058	1.045 ± 0.087	1.009 ± 0.059	1.011 ± 0.082
	60	0.958 ± 0.028	1.060 ± 0.065	1.048 ± 0.104	1.058 ± 0.054
Co	20	1.009 ± 0.050	1.013 ± 0.055	1.040 ± 0.060	0.993 ± 0.094
	40	1.005 ± 0.050	1.038 ± 0.062	0.978 ± 0.044	0.967 ± 0.045
	60	1.025 ± 0.060	1.019 ± 0.053	1.041 ± 0.073	1.021 ± 0.081
Cr	20	1.14 ± 0.15	1.16 ± 0.14	1.07 ± 0.16	1.07 ± 0.13
	40	1.04 ± 0.15	1.09 ± 0.13	1.05 ± 0.12	0.98 ± 0.13
	60	1.06 ± 0.19	1.08 ± 0.15	1.07 ± 0.13	1.13 ± 0.15
Cs	20	1.02 ± 0.13	1.01 ± 0.14	1.03 ± 0.14	0.97 ± 0.14
	40	1.02 ± 0.15	1.03 ± 0.13	1.05 ± 0.13	1.00 ± 0.14
	60	1.03 ± 0.15	1.05 ± 0.12	1.03 ± 0.13	0.98 ± 0.13
Eu	20	1.023 ± 0.117	0.998 ± 0.106	1.002 ± 0.089	0.991 ± 0.086
	40	0.979 ± 0.088	1.017 ± 0.087	1.025 ± 0.091	1.011 ± 0.088
	60	0.995 ± 0.106	1.006 ± 0.091	1.030 ± 0.108	1.065 ± 0.088
Fe	20	1.024 ± 0.065	1.006 ± 0.059	0.989 ± 0.060	0.971 ± 0.055
	40	0.991 ± 0.079	1.017 ± 0.053	0.974 ± 0.065	0.998 ± 0.054
	60	1.007 ± 0.056	0.994 ± 0.065	1.008 ± 0.062	0.994 ± 0.054
La	20	1.07 ± 0.10	0.95 ± 0.09	0.95 ± 0.15	1.05 ± 0.17
	40	1.00 ± 0.06	0.96 ± 0.15	1.01 ± 0.07	0.98 ± 0.10
	60	0.93 ± 0.12	0.97 ± 0.13	1.04 ± 0.18	1.02 ± 0.13
Na	20	1.035 ± 0.046	0.948 ± 0.053	1.057 ± 0.067	0.965 ± 0.171
	40	1.014 ± 0.056	1.026 ± 0.129	0.992 ± 0.084	1.000 ± 0.065
	60	0.976 ± 0.041	1.009 ± 0.046	1.016 ± 0.090	1.054 ± 0.085
Rb	20	0.99 ± 0.13	1.03 ± 0.11	1.05 ± 0.14	0.95 ± 0.12
	40	1.01 ± 0.11	1.06 ± 0.10	1.05 ± 0.11	0.95 ± 0.10
	60	1.03 ± 0.14	1.03 ± 0.12	1.09 ± 0.12	1.01 ± 0.11
Sc	20	0.982 ± 0.044	0.984 ± 0.059	1.010 ± 0.053	1.003 ± 0.054
	40	0.989 ± 0.044	1.022 ± 0.064	0.986 ± 0.046	0.956 ± 0.052
	60	1.022 ± 0.058	0.986 ± 0.070	1.033 ± 0.054	1.036 ± 0.099
Se	20	0.983 ± 0.053	1.029 ± 0.051	1.036 ± 0.067	1.009 ± 0.063
	40	1.001 ± 0.059	0.997 ± 0.055	0.967 ± 0.067	0.934 ± 0.049
	60	0.993 ± 0.057	1.004 ± 0.052	1.025 ± 0.075	0.970 ± 0.061
Th	20	0.990 ± 0.087	0.952 ± 0.072	0.995 ± 0.090	1.055 ± 0.178
	40	0.955 ± 0.066	1.032 ± 0.079	0.967 ± 0.081	0.911 ± 0.079
	60	1.017 ± 0.090	0.955 ± 0.088	1.027 ± 0.082	1.009 ± 0.150
Zn	20	0.993 ± 0.067	0.983 ± 0.048	0.985 ± 0.040	0.955 ± 0.058
	40	0.975 ± 0.070	1.014 ± 0.040	0.967 ± 0.062	0.976 ± 0.057
	60	1.013 ± 0.058	0.976 ± 0.055	0.990 ± 0.043	0.995 ± 0.044

 R_T and U_T calculated according to Eqs. 1 and 2

Fig. 2 R_T ratios for the short term stability test of selected elements

Acknowledgements This study was undertaken with financial support from FAPESP and CNPq.

References

- Gosling E (2003) Bivalve molluscs—biology, ecology and culture. Fishing News Books, Oxford
- Zschunke A (ed) (2000) Reference materials in analytical chemistry—a guide for selection and use. Springer, Berlin
- ISO, International Organization of Standardization (2006) Certification of reference materials—general and statistical principles—ISO Guide 35. 3rd edn, Geneva
- Lamberty A, Schimmel H, Pauwels J (1997) Fresenius J Anal Chem 360:359
- IAEA, International Atomic Energy Agency (2003) World-wide intercomparison exercise for the determination of trace elements and methylmercury in fish homogenate. IAEA-407, Monaco
- Moreira EG, Vasconcellos MBA, Maihara VA, Catharino MGM, Saiki M (2007) J Braz Soc Ecotoxicol 2:61
- Greenberg RR (2005) SIM 8.16P—toxic metals in seafood—evaluation of measurement results, toxic metals in seafood workshop. SIM General Assembly, Trinidad Tobago

Application of INAA complementary gamma ray photopeaks to the homogeneity study of a mussel candidate reference material

E. G. Moreira · M. B. A. Vasconcellos ·
M. G. M. Catharino · V. A. Maihara ·
M. Saiki

Received: 23 November 2009 / Published online: 30 December 2009
© Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary 2009

Abstract Homogeneity study is one of the steps in reference material, RM, characterization. Due to its inherent characteristics, Instrumental Neutron Activation Analysis, INAA, is an analytical technique of choice for homogeneity testing. An interesting possibility is the use of complementary gamma ray photopeaks to confirm INAA homogeneity test results. In this study, the use of the complementary gamma ray photopeaks of ^{110m}Ag , ^{82}Br , ^{60}Co , ^{134}Cs , ^{152}Eu , ^{59}Fe , ^{140}La , ^{233}Pa (for Th determination), ^{46}Sc and ^{75}Se radionuclides was investigated in the between bottle homogeneity study of a mussel candidate RM under preparation at IPEN-CNEN/SP. Although some photopeaks led to biased element content results, the use of complementary gamma ray photopeaks proved to be helpful in supporting homogeneity study conclusions for the new RM under characterization.

Keywords Reference material · Mussel · Homogeneity · INAA

Introduction

Characterization and certification of reference materials, RMs, of biological and environmental origin is a complex task involving many steps, such as: sampling site selection, sampling layout, material preparation and cleaning, freeze-drying, grinding and sieving, water content control,

homogenization, bottling, sterilization, definition of storage conditions and chemical characterization [1].

One important part in the characterization step is the homogeneity testing whose purpose is to assure that the property values of interest will not present variation among the bottles of the RM, more than allowed by its intended use. In other words, the homogenization of the bulk RM must be done in such a way that any residual inhomogeneity of the material will not be significant when the uncertainty of the analytical method in which the RM is used is concerned [2].

Good precision is the most important figure of merit of an analytical technique to allow it to be used in the homogeneity testing of candidate RMs. Due to its inherent characteristics, Instrumental Neutron Activation Analysis (INAA), is an analytical technique of choice for homogeneity testing [3].

With the use of appropriate INAA measurement schemes it is possible to obtain precise measurement results simultaneously for a large number of elements. Another advantage is the fact that solid samples are analyzed directly and, hence, problems in sample digestion and contamination from reagents are not an issue for the technique. INAA also allows the use of different sample weights, which is usually used in the definition of the minimum sample intake in homogeneity studies.

For element determination by the comparative method of INAA, the activity of a suitable gamma ray decay photopeak, the analytical photopeak, is compared to the same photopeak of a standard of the element. The analytical photopeak is chosen according to resolution (measured by the full width at half-maximum, FWHM), intensity (good counting statistics) and freedom of interferences. INAA handbooks present the recommended analytical photopeaks [4].

E. G. Moreira (✉) · M. B. A. Vasconcellos ·
M. G. M. Catharino · V. A. Maihara · M. Saiki
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP,
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, São Paulo,
SP 05508-000, Brazil
e-mail: emoreira@ipen.br

An interesting possibility is the use of complementary gamma ray photopeaks, for the radionuclides that present them, to confirm the INAA results obtained using the analytical photopeaks. In the context of homogeneity assessment, precision is more important than trueness and the use of complementary gamma rays for element determination may be used to corroborate conclusions about the homogeneity of the reference material, although in some cases the results might present bias.

In this study, the application of the complementary gamma ray photopeaks of ^{110m}Ag , ^{82}Br , ^{60}Co , ^{134}Cs , ^{152}Eu , ^{59}Fe , ^{140}La , ^{233}Pa (for Th determination), ^{46}Sc and ^{75}Se radionuclides was investigated in the between bottle homogeneity study of a mussel candidate RM under preparation at IPEN-CNEN/SP.

Box-plots were used for visual inspection of element content obtained using different gamma ray photopeaks. An analysis of variance approach, ANOVA, was performed to assess the homogeneity among the bottles, considering the result obtained with different gamma ray photopeaks [5, 6].

Experimental

Homogeneity testing layout

With the purpose of obtaining a representative sampling of the batch of the mussel candidate RM, a random stratified scheme was applied for the selection of six bottles used in this study (bottles number 19, 40, 75, 112, 143 and 156), from a total of 171 bottles. The HISTO software, provided by the International Atomic Energy Agency (IAEA), was used for bottles selection [7]. For each bottle, eight subsamples were taken for analysis. The HISTO software was also used for randomization of all subsamples, prior to irradiation and gamma ray measurement. This procedure was necessary in order to avoid interferences from any possible trends that might arise in the results during the measurement campaign.

Sample and elemental standard preparation

Subsamples of approximately 0.150 g were weighed in properly cleaned polyethylene vials using a Shimadzu AEM-5200 analytical balance. Elemental standards were prepared by pipetting Spex standard element solutions onto Whatman paper filters, using variable volume pipettes (Eppendorf or Jencons). For some elements, the original solution was diluted in volumetric flasks prior to pipetting. After drying, paper filters were kept in polyethylene vials with the same geometry as for the samples. Eight subsamples were taken from each bottle for analysis.

Table 1 Radionuclides used in the between bottle homogeneity study

Radionuclide	Energy (keV)	Abundance (%)
^{110m}Ag	657.76 ^a	94.64
	677.62	10.35
	706.68	16.44
	763.94	22.29
	884.69	72.68
	937.49	34.36
	1384.30	24.28
	1505.04	13.04
	554.35	70.76
	619.11	43.44
^{82}Br	698.37	28.49
	776.52 ^a	83.54
	827.83	24.03
	1044.08	27.23
	1317.47	26.48
	1173.24 ^a	99.90
	1332.50	99.98
	604.70	97.56
	795.85 ^a	85.44
	121.78	28.37
^{134}Cs	344.29	26.58
	778.92	12.96
	964.11	14.62
	1085.89	10.16
	1408.00 ^a	20.85
	1099.25 ^a	56.50
	1291.60	43.20
	328.76	20.61
	487.02	44.27
	815.77	22.90
^{152}Eu	1596.21 ^a	95.40
	300.18	6.20
	312.01 ^a	36.0
	889.28 ^a	99.98
	1120.55	99.99
	136.01	59.00
	264.66 ^a	59.20
	279.54	25.20
^{59}Fe		
^{140}La		
^{233}Pa		
^{46}Sc		
^{75}Se		

^a Recommended photopeak energy

Irradiation and element determination

Subsamples and elemental standards were irradiated simultaneously for 8 h at $10^{12} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ thermal neutron flux of the IEA-R1 Nuclear Research Reactor at IPEN-CNEN/SP. ^{82}Br and ^{140}La radionuclides were measured for 1.5 h, after a 7-day decay period, while ^{110m}Ag , ^{60}Co , ^{134}Cs , ^{152}Eu , ^{59}Fe , ^{233}Pa , ^{75}Se and ^{46}Sc radionuclides were

measured for 10 h, after a 15-day decay period. Gamma ray measurements were performed using a GC2018 Canberra HPGe detector coupled to a Canberra DSA-1000 multichannel analyzer. Gamma ray spectra were collected and processed using a Canberra Genie 2000 version 3.1 spectroscopy software. Element content calculations were carried out using a Microsoft Excel spreadsheet.

Table 1 presents radionuclides, their corresponding photopeak energies and percent abundances that were used in the INAA investigation of the between bottle homogeneity of the mussel candidate RM [8, 9].

Results and discussion

For representative elements, Fig. 1 shows the obtained box-plots for the comparison of the distributions of the element content results calculated from different photopeaks. Although there were discrepancies among the results obtained for each photopeak, mean and median values as well as interquartile ranges are at the same order of magnitude for most elements and photopeaks analyzed. The

exceptions are the results for La, Th and Eu (displayed in Fig. 1). In the case of Eu, it is clear that the 121 and 964 keV photopeaks are experiencing some positive interference, resulting in higher concentration values. For some radionuclides, whose photopeaks are in the same region of the spectrum and present very similar counting statistics, such as Co, Cs, Fe (displayed in Fig. 1), and, Sc, the obtained results agree much better, suggesting that, at least for the mussel matrix, any of the photopeaks could be used in the determination of these elements.

Table 2 summarizes ANOVA test output results obtained for the mean concentration of eight subsamples from six bottles. The ANOVA test was performed for the results obtained for each radionuclide gamma ray photopeaks.

The null hypothesis of the ANOVA test, H_0 , is that there is no difference among the mean concentration of the bottles, or in other words, sample results come from populations with the same mean. If F , the calculated statistic of the test, is lower than the critical F_c value, there is no evidence to reject H_0 . Hence, the reference material may be considered stable for the test conditions.

Fig. 1 Box-plots for the results obtained for selected elements (eight subsamples), using different photopeak energies

Table 2 ANOVA output for the between bottle homogeneity study

Nuclide	Energy (keV)	<i>F</i>	<i>p</i> -value	<i>F</i> _c ^a
^{110m} Ag	657.76	3.391	0.012	2.438
	677.62	1.068	0.392	2.438
	706.68	0.894	0.494	2.438
	763.94	0.845	0.526	2.438
	884.69	0.586	0.711	2.438
	937.49	1.978	0.102	2.438
	1384.30	0.323	0.896	2.438
	1505.40	1.843	0.125	2.438
⁸² Br	554.35	1.366	0.257	2.438
	619.11	1.547	0.196	2.438
	698.37	2.172	0.075	2.438
	776.52	1.414	0.239	2.438
	827.83	0.700	0.627	2.438
	1044.08	1.300	0.282	2.438
	1317.47	0.552	0.736	2.438
	1173.24	0.732	0.604	2.438
⁶⁰ Co	1332.50	0.504	0.771	2.438
	604.70	1.007	0.426	2.438
¹³⁴ Cs	795.85	0.565	0.726	2.438
	121.78	0.793	0.561	2.438
¹⁵² Eu	344.29	0.838	0.530	2.438
	778.92	3.616	0.008	2.438
	964.11	1.303	0.281	2.438
	1085.89	0.968	0.449	2.438
	1408.00	0.416	0.835	2.438
⁵⁹ Fe	1099.25	1.210	0.321	2.438
	1291.50	1.982	0.101	2.438
¹⁴⁰ La	328.76	2.811	0.028	2.438
	487.02	0.968	0.449	2.438
	815.77	1.548	0.196	2.438
	1596.21	0.639	0.671	2.438
²³³ Pa	300.18	1.391	0.247	2.438
	312.01	0.345	0.883	2.438
⁴⁶ Sc	889.28	1.925	0.110	2.438
	1220.55	1.094	0.378	2.438
⁷⁵ Se	136.01	0.389	0.853	2.438
	264.66	1.138	0.355	2.438
	279.54	3.371	0.012	2.438

^a *F*_c for $\alpha = 0.05$; $v_1 = 5$; $v_2 = 42$

Except for ^{110m}Ag, it was observed that $F < F_c$ for the recommended photopeaks, indicating that the candidate reference material may be considered homogeneous for the investigated elements. For the other ^{110m}Ag photopeaks, $F < F_c$, an indication that the candidate RM may also be considered homogeneous for this element. These results show the usefulness of applying alternative energies in

homogeneity studies. If a 99% confidence level is considered, the results for 658 keV photopeak of ^{110m}Ag (the recommended photopeak) may be considered equal, as at this less restrictive level $F < F_c$ ($F_c = 3.488$).

For the 329 keV (¹⁴⁰La) and 779 keV (¹⁵²Eu) photopeaks, it was observed that $F > F_c$, indicating non homogeneity. However, for these photopeaks very low counting rates were obtained and in some subsamples the elements were not detected in the spectra. For this reason, ANOVA results for these photopeaks should not be considered accurate.

Conclusions

In this study, the application of the complementary gamma ray photopeaks of ^{110m}Ag, ⁸²Br, ⁶⁰Co, ¹³⁴Cs, ¹⁵²Eu, ⁵⁹Fe, ¹⁴⁰La, ²³³Pa (for Th determination), ⁴⁶Sc, and ⁷⁵Se radionuclides was investigated in the between bottle homogeneity study of a mussel candidate reference material under preparation at IPEN-CNEN/SP. Although some photopeaks led to biased element content results, the use of the complementary gamma ray photopeaks proved to be helpful in supporting homogeneity study conclusions for the mussel candidate RM and may be extended to other new reference materials. From the ANOVA test output, it was concluded that the mussel candidate reference material is homogeneous for the analyzed elements.

Acknowledgements Authors are indebted to the financial support received from IPEN-CNEN/SP, FAPESP and CNPq.

References

- Moreira EG, Vasconcellos MBA, Maihara VA, Catharino MGM, Saiki M (2009) J Radioanal Nucl Chem 282:957–962
- ISO (International Organization of Standardization) (2006) Certification of reference materials-general and statistical principles-ISO Guide 35, 3rd edn, Geneva
- Rosbach M, Grobecker RH (1999) J Accred Qual Assur 4:498
- Ehmann WD, Vance DE (1991) Radiochemistry and nuclear methods of analysis. Wiley, New York
- Farrant TJ (1997) Practical statistics for the analytical scientist. LGC, Teddington
- van der Veen AMH, Linsinger T, Pauwels J (2001) J Accred Qual Assur 6:26
- Radecki Z, Trinkl A (2002) Histo-statistical tool for intercomparison exercises and proficiency tests, version 2.1
- IAEA (International Atomic Energy Agency) (1990) Practical aspects of operating a neutron activation analysis laboratory-TECDOC-564, Vienna
- BIPM (International Bureau of Weights and Measures) (2004) Tables of radionuclides, Sèvres

Long-term stability study on a *Perna perna* mussel candidate reference material

Edson Gonçalves Moreira · M. B. A. Vasconcellos ·
 M. G. M. Catharino · V. A. Maihara ·
 M. Saiki

Received: 28 August 2009 / Accepted: 23 December 2009 / Published online: 2 February 2010
 © Springer-Verlag 2010

Abstract The long-term stability study, one of the steps in the characterization of new reference materials, is performed on freeze-dried biological reference materials to verify if they may be stored at room temperature without modification of the property values of interest. In this study, instrumental neutron activation analysis was used in a 12-month long isochronous long-term stability study performed on a *Perna perna* mussel candidate reference material. No trend in the results was observed in respect to measurement order and exposition period to room temperature. The assessment of the analysis of variance test as well as the normalized results to the control temperature showed no systematic changes in the mass fractions of Ag, As, Br, Co, Cr, Cs, Fe, Eu, La, Na, Rb, Sc, Se, Th and Zn during the test period. The result showed that the candidate reference material may be stored at room temperature without significant changes in composition for the determined elements.

Keywords Reference material · Stability study · Mussel · *Perna perna* · Neutron activation analysis · Trace elements

Abbreviations

ANOVA	Analysis of variance
a	Angular coefficient
b	Linear coefficient
CI	Confidence interval
F	F test statistic
F_c	F distribution critical value
H_0	Analysis of variance null hypothesis
INAA	Instrumental neutron activation analysis
MS	Mean square of the ANOVA test
n	Number of determinations
p value	Probability value
Q_T	Ratio of mass fractions
R^2	Linear fit determination coefficient
s_T	Standard deviation
t	Student's t distribution upper critical value
U	Expanded uncertainty
u_a	Uncertainty in the angular coefficient a
u_{ts}	Long-term stability contribution to the uncertainty of the certified value
u_T	Measurement uncertainty
w	Mass fraction
w_T	Mass fraction at temperature T
α	Level of significance
ν	Degree of freedom

Introduction

Due to their intimate contact with sea water, mussels may accumulate toxic trace elements which are a concern from a nutritional point of view. However, mussels are resistant to deleterious effects and remain alive in polluted environments. This fact is used in water quality monitoring studies as toxic elements bioaccumulate in the tissues of the animals [1, 2].

Presented at BERM-12, July 2009, Oxford, UK.

E. G. Moreira (✉) · M. B. A. Vasconcellos ·
 M. G. M. Catharino · V. A. Maihara · M. Saiki
 Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP,
 Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, São Paulo, SP 05508-000, Brazil
 e-mail: emoreira@ipen.br
 URL: <http://www.ipen.br>

To improve the confidence on biomonitoring measurement results and to make it possible to compare results from different locations in time, various quality assurance procedures such as the use of certified reference materials are needed [3]. Stability study is one of the steps in the characterization of new reference materials and it is composed of short-term and long-term stability studies [4]. The short-term stability study is related to the definition of transport conditions in which the material will not suffer degradation. On the other hand, the long-term stability study is used to verify if the new reference material may be stored at defined conditions such as room temperature, as temperature is a key factor in biological material degradation. The output of the stability studies are also used for estimating the contribution of residual instability to the uncertainty of the certified value of reference materials.

The short-term stability study of a new Brazilian mussel candidate reference material has been previously presented [5]. In this study, the mussel candidate reference material was submitted to an isochronous long-term stability study after bottling and gamma ray sterilization, following the premises of ISO Guide 35 [4]. In the isochronous design, the analyses are performed only after all samples are submitted to the conditions of the test. In this case, the measurements may be accomplished in a situation closer to repeatability conditions than in a traditional design, resulting in more precise conclusions from the measurements [6].

In order to implement the long-term stability study, bottles of the material are kept at 20 °C for various time periods up to 12 months. After the test periods, the mass fractions (w) of Ag, As, Br, Co, Cr, Cs, Fe, Eu, La, Na, Rb, Sc, Se, Th and Zn are determined by instrumental neutron activation analysis (INAA). To verify if the material may be stored at room temperature, a comparison of element mass fractions obtained for the bottles to the ones obtained for a bottle kept at the control temperature (−20 °C) is performed. This temperature was chosen as the control temperature for the test, since biological reference materials are usually stable for element content at this temperature.

To exclude the possibility of trends in the results during the measurement campaign, a trend analysis is performed by ordering the results as they are obtained. A linear regression is fitted to the results using the method of least squares and a significance test is performed for the linear regression coefficients. From the regression statistics, it is possible to test the hypothesis that none of the coefficients are significant, i.e., $a = 0$ and $b = \bar{w}$, where a is the angular coefficient (slope), b is the linear coefficient (intercept) and $\bar{w}$ is the mean value of the measured mass fractions [7]. If any trend is detected, the analytical method is not suitable for stability testing [4]. In the case that no trend in the measurement campaign is detected, it is necessary to check for trends according to the periods of exposition at the testing temperature. If any trend is observed, then the material may not be considered stable for the test temperature. For this test, bottle results are ordered according to test temperature exposition periods prior to testing for significance of the linear fit.

After trend analyses, an analysis of variance (ANOVA) approach is used to test each element, taking into account the variability within each bottle (four subsamples) and between bottles. The null hypothesis of the ANOVA test, H_0 , is that there is no difference among the mean mass fraction of the bottles. If F , the calculated statistic of the test, is lower than the critical F_c value, there is no evidence to reject H_0 . Hence, the reference material may be considered stable for the test conditions.

To supplement the ANOVA test, the mean results obtained at 20 °C are normalized for every element to the results obtained at the control temperature (−20 °C), according to Eq. 1:

$$Q_T = \frac{w_{+20^\circ\text{C}}}{w_{-20^\circ\text{C}}} \quad (1)$$

In the case of stability, the ratio Q_T should be equal to 1, considered the combined measurements uncertainty, u_T , which may be estimated from mass fraction, w_T , and its standard deviation, s_T , for measurements obtained at each temperature [8], as given by Eq. 2:

Fig. 1 Isochronous design for the long-term stability study

Temperature/Time	12 months	10 months	08 months	06 months	04 months	02 months	0 months
−20°C	X						
20°C	X						
		X					
			X				
				X			
					X		
						X	

Table 1 Mass fraction in mg kg^{-1} (mean result and confidence interval at 95% confidence level for $n = 4$) obtained by INAA for the long-term stability study of the mussel candidate reference material (wet mass basis)

Time:	2 months	4 months	6 months	8 months	10 months	12 months	12 months
Temp.:	20 °C	20 °C	20 °C	20 °C	20 °C	20 °C	−20 °C
Bottle:	62	14	128	42	99	147	115
Ag	2.36 ± 0.25	2.31 ± 0.10	2.23 ± 0.29	2.25 ± 0.07	2.25 ± 0.21	2.34 ± 0.24	2.21 ± 0.23
As	13.76 ± 0.76	13.50 ± 0.92	14.19 ± 1.27	14.51 ± 0.88	13.63 ± 0.87	13.66 ± 1.17	13.88 ± 1.27
Br	207 ± 38	212 ± 17	205 ± 33	211 ± 19	214 ± 17	222 ± 20	199 ± 33
Co	0.858 ± 0.049	0.849 ± 0.063	0.833 ± 0.055	0.839 ± 0.054	0.830 ± 0.015	0.837 ± 0.046	0.837 ± 0.058
Cr	1.06 ± 0.10	1.06 ± 0.20	1.25 ± 0.04	1.11 ± 0.11	1.04 ± 0.20	1.20 ± 0.05	1.15 ± 0.15
Cs	0.119 ± 0.017	0.114 ± 0.022	0.107 ± 0.014	0.107 ± 0.019	0.101 ± 0.010	0.116 ± 0.009	0.101 ± 0.012
Eu	0.0551 ± 0.0039	0.0505 ± 0.0036	0.0529 ± 0.0075	0.0520 ± 0.0050	0.0535 ± 0.0050	0.0530 ± 0.0026	0.0516 ± 0.0041
Fe	591 ± 25	595 ± 25	608 ± 29	604 ± 18	590 ± 48	604 ± 42	600 ± 29
La	0.695 ± 0.062	0.684 ± 0.065	0.710 ± 0.142	0.742 ± 0.071	0.666 ± 0.048	0.722 ± 0.092	0.719 ± 0.042
Na (%)	1.80 ± 0.24	1.80 ± 0.06	1.94 ± 0.32	2.00 ± 0.23	1.96 ± 0.04	1.93 ± 0.27	1.86 ± 0.30
Rb	4.63 ± 0.23	4.64 ± 0.30	4.84 ± 0.83	4.26 ± 0.65	4.62 ± 0.70	4.70 ± 0.48	4.53 ± 0.79
Sc	0.192 ± 0.020	0.188 ± 0.009	0.183 ± 0.014	0.182 ± 0.006	0.185 ± 0.020	0.194 ± 0.017	0.185 ± 0.016
Se	4.42 ± 0.32	4.53 ± 0.33	4.42 ± 0.06	4.43 ± 0.30	4.44 ± 0.24	4.52 ± 0.18	4.42 ± 0.38
Th	0.264 ± 0.035	0.250 ± 0.013	0.261 ± 0.037	0.247 ± 0.022	0.252 ± 0.030	0.257 ± 0.026	0.257 ± 0.019
Zn	114.5 ± 4.1	115.6 ± 7.6	114.5 ± 4.5	115.5 ± 4.8	112.2 ± 6.1	115.3 ± 7.6	113.2 ± 5.7

Fig. 2 Trend analysis for the stability study of Se: a linear fit for mass fraction results (mg kg^{-1}) in measurement order, b linear fit for mass fraction results (mg kg^{-1}) ordered by time period. Reported uncertainties are expanded uncertainties, $k = 2$

$$u_T = Q_T \sqrt{\left(\frac{s_{+20^\circ\text{C}}}{w_{+20^\circ\text{C}}}\right)^2 + \left(\frac{s_{-20^\circ\text{C}}}{w_{-20^\circ\text{C}}}\right)^2} \quad (2)$$

Experimental

Isochronous layout

The preparation of the candidate reference material has been described elsewhere [9]. Figure 1 presents the 12-month long isochronous design used in this study.

Shadowed spaces represent the testing period for each bottle until time 0, i.e., the time for analyses. A stratified random scheme was used for selection of the seven bottles used. Bottles were kept at $(-20 \pm 2)^\circ\text{C}$ (Continental FC 26 Freezer) and at $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$ (climatized room), for periods that varied from 0 to 12 months. After the test periods, all bottles were stored at -20°C till analysis.

Samples and elemental standards preparation

Four subsamples of approximately 0.150 g from each bottle were weighed in properly cleaned polyethylene bags

Table 2 ANOVA table for the long-term stability test (F_c is the F distribution critical value for the level of significance $\alpha = 0.05$; and degrees of freedom $v_1 = 6$; $v_2 = 21$)

Element	Variation source	Mean square	F test statistic	p value	F_c
Ag	Between	0.0134	0.747	0.619	2.573
	Within	0.0180			
As	Between	0.507	1.196	0.346	2.573
	Within	0.424			
Br	Between	223	0.791	0.587	2.573
	Within	282			
Co	Between	0.00038	0.376	0.886	2.573
	Within	0.00102			
Cr	Between	0.0246	3.422	0.016	2.573
	Within	0.0072			
Cs	Between	0.000212	2.293	0.074	2.573
	Within	0.000092			
Eu	Between	0.00000874	1.081	0.405	2.573
	Within	0.00000809			
Fe	Between	186	0.451	0.836	2.573
	Within	413			
La	Between	0.00261	1.009	0.446	2.573
	Within	0.00259			
Na	Between	0.0244	1.119	0.385	2.573
	Within	0.0218			
Rb	Between	0.129	0.883	0.524	2.573
	Within	0.146			
Sc	Between	0.0000734	0.784	0.592	2.573
	Within	0.0000936			
Se	Between	0.0086	0.286	0.937	2.573
	Within	0.0301			
Th	Between	0.000145	0.496	0.804	2.573
	Within	0.000292			
Zn	Between	6.43	0.467	0.825	2.573
	Within	13.78			

using a Shimadzu AEM-5200 analytical balance. Elemental standards were prepared by pipetting Spex standard element solutions onto Whatman paper filters, using variable volume pipettes (Eppendorf). After drying, paper filters were kept in polyethylene bags with the same geometry as for the subsamples.

Irradiation and element mass fraction determination

After the test periods, subsamples and elemental standards were simultaneously irradiated for 8 h at $10^{12} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ thermal neutron flux of the IEA-R1 Nuclear Research Reactor at IPEN-CNEN/SP. ^{76}As , ^{82}Br , ^{140}La and ^{24}Na radionuclides were measured for 1.5 h, after a 7-day decay period, while $^{110\text{m}}\text{Ag}$, ^{60}Co , ^{51}Cr , ^{134}Cs , ^{59}Fe , ^{152}Eu , ^{86}Rb ,

^{46}Sc , ^{75}Se , ^{233}Pa (for Th) and ^{65}Zn radionuclides were measured for 10 h, after a 22-day decay period [5]. Gamma ray measurements were performed using a Canberra GC2018 HP Ge detector coupled to a Canberra DSA-1000 multichannel analyzer. Gamma ray spectra were collected and processed using a Canberra Genie 2000 version 3.1 spectroscopy software. Element mass fraction calculations were carried out using a Microsoft Excel spreadsheet. Subsamples were irradiated and measured in random in order to avoid interferences from any possible trends that might arise in the results during the measurement campaign.

Results and discussion

Table 1 presents the INAA mass fraction results obtained for the mussel candidate reference material bottles submitted to the test temperatures and various time periods of the long-term stability study. Results are presented on a wet mass basis, as no correction for residual moisture was performed. Confidence intervals were calculated as $CI = t(s/\sqrt{n})$, where t is the upper critical value for the Student's t distribution for $\alpha/2 = 0.025$.

Figure 2 presents mass fraction results for Se arranged in the order they were obtained in the randomized measurement campaign (Fig. 2a) and according to the periods of exposition at the testing temperature of the stability study (Fig. 2b). Uncertainty bars in Fig. 2a represent expanded uncertainties, U , in Se determination via INAA with a coverage factor $k = 2$. The considered sources of uncertainty were: mass of sample and standards, decay constants and sample and standards activities (which include irradiation and gamma ray spectrometry sources) [10]. In Fig. 2b, uncertainty bars are not presented for clarity. It was observed that the linear coefficients (intercepts) of the equations obtained from both linear regression fits correspond to the mean value of the 28 mass fraction results used to plot the linear regression curves. In addition, the angular coefficients (slopes) of the equations tend to zero in Fig. 2a as well as in Fig. 2b. These findings indicate, along with the determination coefficients R^2 , close to zero, that there is no correlation and thus, no trend among the variables. Similar results were obtained for the mass fractions for the other elements.

Table 2 summarizes the ANOVA test output obtained for the mean mass fraction of four subsamples for the seven bottles for each element. As a general trend, it was observed that the within bottle variability (represented by its mean square, MS) was greater or of the same order of magnitude than the between bottle variability. This was an indication that no significant differences were observed among the bottles other than the resulting from the

Table 3 Normalized results of the long-term stability study obtained by INAA (Q_T is the ratio of mass fractions and u_T is the estimated measurement uncertainty, calculated according to Eqs. 1 and 2)

Element	$Q_T \pm u_T$					
	2 months	4 months	6 months	8 months	10 months	12 months
Ag	1.068 $\pm$ 0.099	1.045 $\pm$ 0.074	1.011 $\pm$ 0.093	1.018 $\pm$ 0.070	1.021 $\pm$ 0.090	1.062 $\pm$ 0.098
As	0.991 $\pm$ 0.066	0.973 $\pm$ 0.070	1.022 $\pm$ 0.081	1.045 $\pm$ 0.072	0.982 $\pm$ 0.069	0.984 $\pm$ 0.078
Br	1.04 $\pm$ 0.16	1.07 $\pm$ 0.12	1.03 $\pm$ 0.15	1.06 $\pm$ 0.13	1.08 $\pm$ 0.13	1.12 $\pm$ 0.13
Co	1.025 $\pm$ 0.058	1.014 $\pm$ 0.065	0.995 $\pm$ 0.062	1.002 $\pm$ 0.060	0.992 $\pm$ 0.045	1.000 $\pm$ 0.056
Cr	0.93 $\pm$ 0.09	0.92 $\pm$ 0.13	1.09 $\pm$ 0.12	0.97 $\pm$ 0.10	0.91 $\pm$ 0.13	1.05 $\pm$ 0.09
Cs	1.18 $\pm$ 0.14	1.13 $\pm$ 0.16	1.06 $\pm$ 0.10	1.06 $\pm$ 0.14	1.00 $\pm$ 0.10	1.15 $\pm$ 0.10
Eu	1.067 $\pm$ 0.071	0.978 $\pm$ 0.066	1.025 $\pm$ 0.071	1.008 $\pm$ 0.063	1.037 $\pm$ 0.080	1.027 $\pm$ 0.061
Fe	0.986 $\pm$ 0.040	0.991 $\pm$ 0.040	1.013 $\pm$ 0.043	1.007 $\pm$ 0.036	0.984 $\pm$ 0.059	1.006 $\pm$ 0.054
La	0.966 $\pm$ 0.065	0.950 $\pm$ 0.067	0.987 $\pm$ 0.052	1.031 $\pm$ 0.073	0.926 $\pm$ 0.054	1.004 $\pm$ 0.089
Na	0.97 $\pm$ 0.13	0.97 $\pm$ 0.10	1.04 $\pm$ 0.15	1.08 $\pm$ 0.14	1.05 $\pm$ 0.11	1.04 $\pm$ 0.14
Rb	1.02 $\pm$ 0.12	1.02 $\pm$ 0.12	1.07 $\pm$ 0.15	0.94 $\pm$ 0.14	1.02 $\pm$ 0.15	1.04 $\pm$ 0.13
Sc	1.039 $\pm$ 0.088	1.018 $\pm$ 0.062	1.017 $\pm$ 0.075	0.982 $\pm$ 0.055	1.002 $\pm$ 0.086	1.048 $\pm$ 0.081
Se	0.999 $\pm$ 0.070	1.023 $\pm$ 0.073	0.999 $\pm$ 0.077	1.001 $\pm$ 0.069	1.004 $\pm$ 0.064	1.021 $\pm$ 0.061
Th	1.028 $\pm$ 0.098	0.971 $\pm$ 0.055	1.015 $\pm$ 0.065	0.962 $\pm$ 0.070	0.981 $\pm$ 0.085	0.999 $\pm$ 0.078
Zn	1.012 $\pm$ 0.039	1.021 $\pm$ 0.053	1.012 $\pm$ 0.044	1.021 $\pm$ 0.042	0.992 $\pm$ 0.046	1.018 $\pm$ 0.053

Fig. 3 $Q_T \pm u_T$ ratios for the long-term stability study of selected elements by INAA (Q_T is the ratio of mass fractions and u_T is the estimated measurement uncertainty, calculated according to Eqs. 1 and 2)

precision of the INAA method used. Except for Cr, $F < F_c$ at the 95% confidence level for all elements, indicating that there were no significant differences among the mean mass

fractions obtained, regardless of the period and temperature at which the bottles were kept. In the case of Cr, if a 99% confidence level is considered, the results may be

considered equal as $F < F_c$ ($F_c = 3.811$) when the less restrictive level is used. These conclusions are corroborated by the obtained p values which, with the exception of Cr, were all greater than the level of significance $\alpha = 0.05$.

Table 3 presents the normalized results of the long-term stability study as defined in “Introduction”. The obtained Q_T ratios were comprised between the respective $Q_T - u_T$ and $Q_T + u_T$ ranges, and hence, no instability may be concluded. To illustrate, Fig. 3 shows Q_T values for selected elements. Even though Cr failed the ANOVA test at the 95% confidence level, no significant degradation was observed from its plot, and it was concluded that this element was also stable in this study. The same conclusion may be drawn for the Cs plot, which although passing the ANOVA test for equality of mean values presented an F value close to the critical value F_c . The observed variations for these elements seem to be related to poor precision and not to any degradation during the test period.

For the estimation of the shelf life period from the long-term stability data, ISO Guide 35 suggests that u_a , the uncertainty in the angular coefficient a , of the linear regression fit multiplied by a suitable shelf life period in months be used as the long-term stability contribution of uncertainty, u_{ls} , to the combined uncertainty of the certified value [4]. The quantity u_a is promptly available from the output of the ANOVA test for linear regression. However, for the expected shelf life for this kind of matrix material, obtained u_{ls} results were high when compared to the combined uncertainty of the INAA mass fraction results. The ISO Guide 35 approach seems to be very conservative. Possibly, the limitation is that it assumes the degradation as occurring at a regular pace over time following a linear model. This usually is not the case for element mass fraction in biological reference materials. In this study, an intermediate approach is intended for the certification of the mussel reference material. First, u_{ls} estimation for shorter shelf life periods will be performed, in order to obtain acceptable values (in comparison to certified values). Then, a scheme for checking the stability after certification will be proposed in order to extend the shelf life of the reference material.

A collaborative study, proposed for the certification of the reference material, is still in process. Hence, it is not possible at the moment to verify the impact of the stability contribution to the overall uncertainty of assigned certified values.

Conclusion

With the application of the INAA method to the isochronous long-term stability study, it was possible to confirm, on statistical grounds, that there were no systematic changes in mass fraction for 15 elements during the time period of this study. Thus, it may be concluded that the candidate mussel reference material is stable enough to be stored at room temperature, without any significant changes in mass fraction for the determined elements. The results from this study will be subsequently used in the assessment of the long-term stability uncertainty contribution to the expanded uncertainties of certified values of the mussel reference material under characterization and in the definition of a suitable shelf life for the material.

Acknowledgments This study was supported by the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP) and the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

References

- Gosling E (2003) Bivalve molluscs—biology, ecology and culture. Fishing News Books, Oxford
- Catharino MGM, Vasconcellos MBA, Sousa ECPM, Moreira EG, Pereira CDS (2008) Biomonitoring of Hg, Cd, Pb and other elements in coastal regions of São Paulo State, Brazil, using the transplanted mussel *Perna perna* (Linnaeus, 1758). *J Radioanal Nucl Chem* 278:547–551
- Zschunke A (2000) Reference materials in analytical chemistry—a guide for selection and use. Springer, Berlin
- International Organization for Standardization (2006) ISO Guide 35. Reference materials—general and statistical principles for certification. ISO, Geneva, Switzerland
- Moreira EG, Vasconcellos MBA, Catharino MGM, Maihara VA, Saiki M (2009) *Perna perna* mussel reference material: short term stability assessment. *J Radioanal Nucl Chem* 282:957–962
- Lamberty A, Schimmel H, Pauwels J (1997) The study of the stability of reference materials by isochronous measurements. *Fresenius J Anal Chem* 360:359–361
- Farrant T (1997) Practical statistics for the analytical scientist—a bench guide. LGC, Teddington
- Azemard S, Mora SJ, de Guitart C, Wyse E (2006) World-wide intercomparison exercise for the determination of trace elements and methylmercury in fish flesh homogenate IAEA-436. IAEA, Monaco
- Moreira EG, Vasconcellos MBA, Maihara VA, Catharino MGM, Saiki M (2007) Mussel reference material preparation proposal as a quality assurance tool for Brazilian seashore biomonitoring. *J Braz Soc Ecotoxicol* 2:61–65
- Moreira EG, Vasconcellos MBA, Saiki M (2006) Uncertainty assessment in instrumental neutron activation analysis of biological materials. *J Radioanal Nucl Chem* 269:377–382

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *Ensaaios de proficiência por comparações interlaboratoriais Parte 1: Desenvolvimento e operação de programas de ensaios de proficiência*. 1 ed. Rio de Janeiro: ABNT, 1999a (ABNT ISO/IEC Guia 43-1).
- ABNT, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *Ensaaios de proficiência por comparações interlaboratoriais Parte 2: Seleção e uso de programas de ensaios de proficiência por organismos de credenciamento de laboratórios*. 1 ed. Rio de Janeiro: ABNT, 1999b (ABNT ISO/IEC Guia 43-2).
- ABNT, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *Termos e definições relacionados com materiais de referência*. 1 ed. Rio de Janeiro: ABNT, 2000a (ABNT ISO Guia 30).
- ABNT, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *Calibração em química analítica e uso de materiais de referência*. 1 ed. Rio de Janeiro: ABNT, 2000b (ABNT ISO Guia 32).
- ABNT, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *Utilização de materiais de referência certificados*. 1 ed. Rio de Janeiro: ABNT, 2002 (ABNT ISO Guia 33).
- ABNT, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *Materiais de referência - conteúdo de certificados e rótulos*. 2 ed. Rio de Janeiro: ABNT, 2004a (ABNT ISO Guia 31).
- ABNT, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *Requisitos gerais para a competência de produtores de materiais de referência*. 1 ed. Rio de Janeiro: ABNT, 2004b (ABNT ISO Guia 34).
- ABNT, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração*. 2 ed. corrigida. Rio de Janeiro: ABNT, 2006 (ABNT NBR ISO/IEC 17025).
- ABNT/INMETRO/SBM, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS/INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL/SOCIEDADE BRASILEIRA DE METROLOGIA. *Guia para a expressão da incerteza de medição*. 3 ed. Rio de Janeiro: INMETRO, 2003 (ISO GUM).
- AMC, ANALYTICAL METHODS COMMITTEE, Robust Statistics – How not to Reject Outliers. Part 1. Basic Concepts. *Analyst*, v. 114, p. 1693-1697, 1989.
- ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, *Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos*, Resolução de Diretoria Colegiada, RDC nº 12, 02 jan. 2001
- AZEMARD, S.; de MORA, S. J.; GUITARD, C.; WYSE, E. *World-wide intercomparison exercise for the determination of trace elements and methylmercury in fish flesh homogenate IAEA-436*. Mônaco: IAEA, 2006.

BERCKER, D. A. Reflections on 35 years of biological SRM production and analyses. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, v. 269, n. 2, pp. 365-369, 2006.

BIÈVRE, P. de; KAARLS, R.; PEISER, H. S.; RASBERRY, S. D.; REED, W. P., Measurement principles for traceability in chemical analysis. *Accred. Qual. Assur.*, v. 1, p. 3-13, 1996.

BIÈVRE, P. de; KAARLS, R.; PEISER, H. S.; RASBERRY, S. D.; REED, W. P., Protocols for traceability in chemical analysis. Part I: Definitions and terminology. *Accred. Qual. Assur.*, v. 2, p. 168-179, 1997a.

BIÈVRE, P. de; KAARLS, R.; PEISER, H. S.; RASBERRY, S. D.; REED, W. P., Protocols for traceability in chemical analysis. Part II: Design and use. *Accred. Qual. Assur.*, v. 2, p. 270-274, 1997b.

BISPO, J. M. A. *Certificação de material de referência de minério de ferro utilizando programa interlaboratorial* (2006) Dissertação de mestrado – Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo.

BOTHA A.; EMONS, H.; FAJGELJ, A.; HAMMOND, J.; SAUVAGE, S. VEEN, A. M. H. van der. *Developments in international standardization related to reference materials*. In: BIOLOGICAL AND ENVIRONMENTAL REFERENCE MATERIALS SYMPOSIUM, 12th, 7-10 jul, 2009. Oxford, UK: *Presentations*. Disponível em: <<http://www.berm12.com/presentations.php>>. Acesso em: 18 out. 2009.

CALLIL, C. T. *Utilização de moluscos como indicadores de mercúrio: proposta de biomonitoração*. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA, 5^o, 05-08 out, 1998. Itajaí, SC: *Anais...* Itajaí, CD-ROM, 1998,

CETAL, CENTRO TECNOLÓGICO DE ANÁLISE DE ALIMENTOS, *Certificado de Análise Físico-química n° 3119/08*, 2008.

CETEM, CENTRO DE TECNOLOGIA MINERAL, *Certificado de análise, BXPA-1, Bauxita (Juriti, Pará-Brasil)*, 2007a.

CETEM, CENTRO DE TECNOLOGIA MINERAL, *Certificado de análise, CBPA-1, Minério de sulfetos de cobre (Mina do Sossego, Pará)*, 2007b.

CETEM, CENTRO DE TECNOLOGIA MINERAL, *Certificado de análise, CBPA-2, Concentrado de sulfetos de cobre (Mina do Sossego, Pará)*, 2007c.

COMAR, *The international database for certified reference materials*. Disponível em: <<http://www.comar.bam.de/>>. Acesso em: 08 jun. 2007.

COTTA, A. J. B.; ENZWEILER, J. Certificate of analysis of the Reference Material BRP-1 (Basalt Ribeirão Preto). *Geostand. Geoanal. Res.* v. 32, n. 2, p. 231-235, 2008.

CTR, CENTRO DE TECNOLOGIA DAS RADIAÇÕES DO IPEN - CNEN/SP. *Certificado de Dosimetria LDPI-285/2007*, 2007.

CURRIE, L. A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). *Anal. Chim. Acta*, v. 391, p. 105-126, 1999.

DICKSON, J. S. Radiation inactivation of microorganisms. In: MOLINS, R. A. (Ed.). *Food Irradiation: Principles and applications*, 1 ed. New York, N.Y.: Wiley-Interscience, 2001. p. 23-35.

DUNG, H. M.; FREITAS, M. C.; SARMENTO, S.; BLAAUW, M., BEASLEY, D. Calibration of gamma-ray spectrometers coupled to Compton suppression and fast pneumatic systems for the k_0 -standardized NAA method. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* v. 278, n. 3, p. 621-625, 2008.

EC, EUROPEAN COMMISSION. *Certification report – The certification of the mass fraction of As, Cd, Cu, Hg, Mn, Pb, Se and Zn in mussel tissue (mytilus edulis), CRM 278R*, 1998.

EC, EUROPEAN COMMISSION. *Certification report – The certification of the contents (mass fractions) of Ce, Dy, Er, Eu, Gd, La, Lu, Nd, Pr, Sm, Tb, Tm, Y, Th and U in mussel tissue), CRM 668*, 2001.

EHMANN, W. D.; VANCE, D. E. *Radiochemistry and nuclear methods of analysis*. 1. ed. New York, NY: John Wiley, 1991.

EMBRAPA, EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, *Editais MCT/CNPq/MAPA nº 64/2008: Centro colaborador em defesa agropecuária: produção de materiais de referência certificados e organização de ensaios de proficiência de resíduos e contaminantes inorgânicos*. Disponível em: <http://www.cppse.embrapa.br/eplna/eplna_programacao>. Acesso em: 12 abr. 2010.

EMONS, H. *Expectations and impact of reference materials in measurement and testing*. In: BIOLOGICAL AND ENVIRONMENTAL REFERENCE MATERIALS SYMPOSIUM, 12th, 7-10 jul, 2009. Oxford, UK: *Presentations*. Disponível em: <<http://www.berm12.com/presentations.php>>. Acesso em: 18 out. 2009.

EMONS, H.; FAJGELJ, A.; VEEN, A. M. H. van der. New definitions on reference materials. *Accred. Qual. Assur.* v. 10, p. 576-578, 2006.

EURACHEM/CITAC, EURACHEM/CO-OPERATION ON INTERNATIONAL TRACEABILITY IN ANALYTICAL CHEMISTRY. *Guide on quantifying uncertainty in analytical measurement*. 2. ed. 2000 (QUAM: 2000.1).

FAO, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, *Fisheries Global Information System - Capture and aquaculture production*. Disponível em: <<http://www.fao.org/fishery/statistics/global-production/en>>. Acesso em: 04 set. 2009.

FAO, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, *State of world aquaculture – 2006*, FAO Fisheries Technical Paper nº 500, Rome, Italy: FAO, 2006.

FAO, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, *Fisheries Global Information System - Capture and aquaculture production*. Disponível em: <<http://www.fao.org/fishery/statistics/global-production/en>>. Acesso em: 04 set. 2009.

FAPESP, FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO, *Projeto de pesquisa temático INCTAA: Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas Avançadas: Produção de materiais de referência e criação de rede interlaboratorial (ensaio de proficiência)*. Disponível em: <<http://www.bv.fapesp.br/projetos-tematicos/2242/instituto-nacional-ciencias-tecnologias-analiticas-avancadas/>>. Acesso em: 12 abr. 2010.

FARKAS, J. Irradiation as a method for decontaminating food - A review. *Int. J. Food Microbiol.* v. 44, n. 3 p.189-204, 1998.

FARRANT, T. *Practical Statistics for the analytical scientist – a bench guide*. Cambridge, UK: LGC, 1997.

FINEP, FINANCIADORA DE ESTUDOS E PROJETOS, **SIBRATEC - Sistema Brasileiro de Tecnologia**. Disponível em: <<http://www.finep.gov.br/programas/sibratec.asp>>. Acesso em: 10 out. 2009.

FREITAS, M. C.; REIS, M. A.; MARQUES, A. P.; ALMEIDA, S. M.; FARINHA, M. M.; OLIVEIRA, O.; VENTURA, M. G.; PACHECO, A. M. G.; BARROS, L. I. C. Monitoring of environmental contaminants: 10 years of application of k_0 -INAA. **J. Radioanal. Nucl. Chem.** v. 257, n. 3, p. 621-625, 2003.

FURLAN, E. F.; GALVÃO, J. A.; SALÁN, E. O.; YOKOYAMA, V. A.; OETTERER, M. Estabilidade físico-química e mercado do mexilhão (*Perna perna*) cultivado em Ubatuba - SP. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v. 27, p. 787-793, 2007.

GOSLING, E. **Bivalve molluscs - Biology, ecology and culture**, Oxford, UK: Blackwell, 2003.

GREEMBERG, R. R. **SIM 8.16P - Toxic metals in seafood - Evaluation of measurement results**, Toxic metals in seafood workshop. SIM General Assembly, Trinidad Tobago, 2005.

GUIMARÃES, M. M; SILVA, M. S. Valor nutricional e características químicas e físicas de frutos de murici-passa (*Byrsonima verbascifolia*), **Ciênc. Tecnol. Aliment.** vol. 28, n. 4, p. 817-821, 2008.

HORVAT, M.; LIANG, L.; AZEMARD, S.; MANDIC, V. Certification of total mercury and methylmercury concentrations in mussel homogenate (*Mytilus edulis*) reference material, IAEA-142. **Fresenius J. Anal. Chem.** v. 358, p. 411-418, 1997.

IAEA, INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, **Practical Aspects of Operating a Neutron Activation Analysis Laboratory**. TEC-DOC-564, Viena, Áustria 1990.

IAEA, INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, **World-wide intercomparison exercise for the determination of trace elements and methylmercury in fish homogenate IAEA-407**, Monaco, 2003.

IAEA, INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, **Preparation of reference materials and organization of proficiency test rounds**, (IAEA INT 1/054 Interregional project), 2003-2005. Disponível em: <<http://www.iaea.org/programmes/aqcs/int1054/index.html>>. Acesso em: 01 set. 2009a.

IAEA, INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, **Improvement of analytical quality through proficiency testing and certification of matrix reference materials using nuclear and related analytical techniques in the Latin American nuclear analytical techniques network**, (IAEA Technical Cooperation Project RLA/2/014 - ARCAL XCVII, 2009-2011). Disponível em: <http://www-tc.iaea.org/tcweb/projectinfo/projectinfo_body.asp> Acesso em: 01 set. 2009b.

IAL, INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. Brasília: Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2005.

INMETRO, INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos**, revisão 02, Rio de Janeiro: INMETRO, 2007 (DOQ-CGCRE-008).

INMETRO, INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, *Projeto Piloto para Acreditação de Produtores de Materiais de Referência segundo requisitos do ABNT ISO Guia 34 em combinação com a norma ABNT NBR ISO/IEC 17025*. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/produtoresMat.asp>>. Acesso em: 09 out. 2009.

IRMM, INSTITUTE FOR REFERENCE MATERIALS AND MEASUREMENT, *Certificate of analysis, ERM-CE 278, Mussel tissue*, 2004.

ISO, INTERNATIONAL ORGANIZATION OF STANDADIZATION. *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Practical guidance for the use of ISO 5725-2:1994 in designing, implementing and statistically analysing interlaboratory repeatability and reproducibility results*. Geneva, 2005 (ISO/TR 22971).

ISO, INTERNATIONAL ORGANIZATION OF STANTARDIZATION. *Reference materials - General and statistical principles for certification*. 3 ed. Geneva: 2006 (ISO Guide 35).

ISO, INTERNATIONAL ORGANIZATION OF STANTARDIZATION. *Conformity assessment – General requirements for proficiency testing*. 1 ed. Geneva: 2010 (ISO/IEC 17043:2010).

IYENGAR, V.; WOLF, W., Global activities in the world of reference materials including the needs of developing countries. *Fresenius J. Anal. Chem.*, v. 360, p.282-286, 1998.

JILLAVENKATESA, A.; DAPKUNAS, S. J.; LUM, L. H. *Particle size characterization*, NIST Special Publication 960-1, Washington, DC: NIST, 2001.

JCGM, JOINT COMMITTEE FOR GUIDES IN METROLOGY. *International vocabulary of metrology - basic and general concepts and associated terms*, JCGM 200:2008, (VIM3).

KAARLS, R. *The essential relationship between global metrology and the production of (certified) reference materials*. In: BIOLOGICAL AND ENVIRONMENTAL REFERENCE MATERIALS SYMPOSIUM, 12th, 7-10 jul, 2009. Oxford, UK: *Presentations*. Disponível em: < <http://www.berm12.com/presentations.php>>. Acesso em: 18 out. 2009.

KAYASTH, S., SWAIN, K. R. Role of analytical chemistry in environmental monitoring. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* v. 262, n. 1, p. 35-42, 2004.

KRAMER, K. J. M.; KRAMER, G. N; MUNTAU, H. *Practical manual for the production of laboratory reference materials*, Bergen, Netherlands: Mermayde, 2001.

KIPPAX, P. Appraisal of the laser diffraction particle-sizing technique. *Pharm. Tech.*, mar., p. 88-96, 2005.

LAMBERTY, A.; SCHIMMEL, H.; PAUWELS, J. The study of the stability of reference materials by isochronous measurements. *Fresenius J. Anal. Chem.* v. 360, p. 359-361, 1997.

LINDESTROM, R. M. Reference material certification by prompt-gamma activation analysis. *Fresenius J. Anal. Chem.* v. 360, p. 322-324, 1998.

LINSINGER, T. P. J., PAUWELS, J.; van der VEEN, A. M. H.; SCHIMMEL, H.; LAMBERTY, A. Homogeneity and stability of reference materials. *Accred. Qual. Assur.* v. 6, p. 20-25, 2001.

LUNETTA, J. E. *O florescimento da mitilicultura no Brasil*, in: SIMPÓSIO DE BIOLOGIA MARINHA, XVII, 25-24 nov. 2002. *Caderno de resumos e palestras*, p. 15-22. Disponível em: <http://www.usp.br/cbm/novo_site/simposio/simp_xvii/caderno_xvii.pdf>. Acesso em: 05 mai. 2006.

MAIHARA, V. A.; FÁVARO, D. I. T.; VASCONCELLOS, M. B. A.; SATO, I. M.; SALVADOR, V. L. R.; MANTOVANI, D. M. B.; MORGANO, M. A.; MAIO, F. D.; CANTAGALLO, M. I.; SISTI, C.; DANTAS, E. S. K.; SHIHOMATSU, H. M. *Estudo interlaboratorial: material de referência secundário fígado bovino*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE METROLOGIA, 3º, 01-05 set, 2003, Recife, PE: *Anais ...* Recife: SBM, CD-ROM., 2003.

MARKERT, B.; WAPPELHORST, O.; WECKERT, V.; HERPIN, U.; SIEWERS, U.; FRIESE, K.; BREULMANN, G. The use of bioindicators for monitoring the heavy-metal status of the environment. *J. Radioanal. Nucl. Chem*, v. 240, n. 2, p. 425-429, 1999.

MAY, W.; PARRIS, R.; BECK, C.; FASSETT, J.; GREENBERG, R.; GUENTHER, F.; KRAMER, G.; WISE, S.; GILLS, T.; COLBERT, J.; GETTINGS, R. MacDonald, B. *Definitions of terms and modes used at NIST for value-assignment of reference materials for chemical Measurements*. NIST Special Publication 260-136, Gaithersburg: NIST, 2000.

MEDEIROS, I. D.; ALMEIDA, E. A.; VENTURA, E. C.; MÜLLER, I. C.; MEZZARI, M. P.; BAINY, A. C. D. *Biomonitoramento da contaminação aquática na Baía Norte da Ilha de Santa Catarina utilizando mexilhões Perna perna como organismos sentinela*. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA, 5º, 05-08 out, 1998. Itajaí, SC: *Anais...* Itajaí: CD-ROM, 1998.

MEDEIROS, K. J. *Avaliação dos efeitos de uma dieta à base de mexilhões Perna perna (Linné, 1758) em relação aos teores de colesterol, triglicerídeos e lipoproteínas em cobaias (Cavia porcellus)*. (2001) Dissertação de mestrado - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

MESL, IAEA MARINE ENVIRONMENT STUDIES LABORATORIES. *Mineralization procedures for sediment and biological materials*. Standard operating procedures, IAEA, Mônaco, 1998.

METTLER-TOLEDO, *Fundamentals of the coulometric Karl Fischer titration with selected applications*. Applications brochure 32, Greifensee, Switzerland: Mettler-Toledo, 2002.

MOLINS, R. A. (Ed.). *Food Irradiation: Principles and applications*, 1 ed. New York, N.Y.: Wiley-Interscience, 2001.

MOREIRA, E. G.; MAIHARA, V. A.; CATHARINO, M. G. M.; VASCONCELLOS, M. B. A.; SAIKI, M. *Report on NIST-CCHEN SIM 8.16P Pilot Study: Elements in seafood*, 2005.

MOREIRA, E. G.; VASCONCELLOS, M. B. A.; SAIKI, M. Uncertainty assessment in instrumental neutron activation analysis of biological materials. *J. Radioanal. Nucl. Chem*. v. 269, n. 2, p. 377-382, 2006.

MOREIRA, E. G.; VASCONCELLOS, M. B. A.; CATHARINO, M. G. M.; MAIHARA, V. A.; SAIKI, M. *Perna perna mussel reference material: short term stability assessment*. *J. Radioanal. Nucl. Chem*. v. 282, p. 957-962, 2009.

MOREIRA, E. G.; VASCONCELLOS, M. B. A.; CATHARINO, M. G. M.; MAIHARA, V. A.; SAIKI, M. Application of INAA complementary gamma ray photopeaks to the homogeneity study of a mussel candidate reference material. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* v. 283, n. 3, p. 819-822, 2010a.

MOREIRA, E. G.; VASCONCELLOS, M. B. A.; CATHARINO, M. G. M.; MAIHARA, V. A.; SAIKI, M. Long term stability on a *Perna perna* mussel candidate reference material. *Accred. Qual. Assur.* v.14, n. 4, p. 233-238, 2010b.

NIST, NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS & TECHNOLOGY, *Certificate of analysis, SRM 2974, Organics in freeze-dried mussel tissue (mytilus edulis)*, 1997.

NIST, NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS & TECHNOLOGY, *Certificate of analysis, SRM 2976, Mussel tissue (trace elements and methylmercury)*, 1998.

NIST, NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS & TECHNOLOGY, *Certificate of analysis, SRM 1974a, Organics in mussel (mytilus edulis)*, 1999.

NIST, NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS & TECHNOLOGY, *Certificate of analysis, SRM 2977, Mussel tissue (organic contaminants and trace elements)*, 2000a.

NIST, NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS & TECHNOLOGY, *Certificate of analysis, SRM 2978, Mussel tissue (organic contaminants – Raritan Bay, New Jersey)*, 2000b.

NIST, NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS & TECHNOLOGY, *Certificate of analysis, SRM 1566b, Oyster tissue*, 2001.

NIST, NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS & TECHNOLOGY, *Certificate of analysis, SRM 1974b, Organics in mussel (mytilus edulis)*, 2003.

NIST/SEMATECH, NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS & TECHNOLOGY/ SEMICONDUCTOR MANUFACTURING TECHNOLOGY CONSORTIUM, *NIST/SEMATECH e-Handbook of Statistical Methods*. Disponível em: <<http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/>, date>. Acesso em: 27. abr. 2009.

NRCC, NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA, *Certificate of analysis, DORM-2, Dogfish muscle certified reference material for trace metals*, 1999.

NRCC, NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA, *Certificate of analysis, DOLT-3, Dogfish liver certified reference material for trace metals*, 2002.

OLIVEIRA JÚNIOR, O. P. *Preparação, caracterização e certificação de materiais de referência isotópicos de urânio* (2006) Tese de Doutorado - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

ORIGINLAB, *Origin reference for V8 SR5*, Disponível em: <http://www.originlab.com/www/helponline/Origin8/en/origin.htm#stats/normality_test.htm>. Acesso em: 07 dez. 2009.

PANNE, U. *Looking into the crystal ball*. In: BIOLOGICAL AND ENVIRONMENTAL REFERENCE MATERIALS SYMPOSIUM, 12th, 7-10 jul, 2009. Oxford, UK: *Presentations*. Disponível em: <<http://www.berm12.com/presentations.php>>. Acesso em: 18 out. 2009.

PARISENTI, J.; TRAMONTE, V. L. C. G.; FACCIN, G. L., Composição centesimal de mexilhões *Perna perna*, crus e cozidos, coletados em diferentes estações do ano na cidade de Florianópolis/SC. *Hig. Aliment.* n. 22 p. 84-88, 2008.

PARRY, S. J. *Handbook of neutron activation analysis*, Surrey, UK: Viridian Publishing, 2003.

PEREIRA, C. D. S. *Biomarcadores de exposição, efeito e bioacumulação de xenobióticos em mexilhões Perna perna (Linnaeus, 1758) transplantados ao longo do litoral de São Paulo*. (2008) Tese de doutoramento - Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, São Paulo.

PEREIRA, O. M.; HENRIQUES, M. B.; ZENEBON, O.; SAKUMA, A.; KIRA, C. S. Determinação dos teores de Hg, Pb, Cd, Cu e Zn em moluscos (*Crassostrea brasiliana*, *Perna perna* e *Mytella falcata*). *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v. 61, n. 1, p. 19-25, 2002.

PEREIRA, O. M.; GELLI, V. C.; HENRIQUES, M. B.; MACHADO, I. C.; BASTOS, A. A. *Programa de desenvolvimento da criação ordenada de moluscos bivalves no estado de São Paulo* in: Relatório Técnico do Instituto de Pesca, n. 2 [s. d.]. Disponível em: < <http://www.pesca.sp.gov.br/reltec2.htm> >. Acesso em: 02 set. 2009.

POVINEC, P. P.; PHAM, M. K. IAEA reference materials for quality assurance of marine radioactivity measurements, *J. Radioanal. Nucl. Chem.* v. 248, n. 1, p. 211-216, 2001.

PONÇANO, V. M.; *Implementação da metrologia química no Brasil: Organização de redes de laboratórios e estruturação das atividades de produção de materiais de referência*, PADCT TIB 01/98, 4º Relatório Técnico, 2003.

PRÓSPERI, V. A.; NASCIMENTO, I. A.; Avaliação ecotoxicológica de ambientes marinhos e estuarinos. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Ed.). *Ecotoxicidade aquática - princípios e aplicações*, São Carlos: Rima Editora, 2006. p. 270-292.

RADECKI, Z; TRINKL, A. Histo – Statistical tool for intercomparison exercises and proficiency tests, version 2.1, 2002.

RIOS, E. C.; *Seashells of Brazil*, 2 ed. Rio Grande, RS: Editora da Fundação Universidade do Rio Grande, 1984.

ROSSBACH, M.; GROBECKER, K. H. Homogeneity studies of reference materials by solid sampling – AAS and INAA. *Accred. Qual. Assur.* v. 4, p. 498-503, 1999.

ROSSBACH, M.; BLAAUW, M.; BACCHI, M. A.; LIN, X. The k_0 -IAEA program. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* v. 274, n. 3, p. 657-662, 2007.

SEMMLER, M. G. M. C. *Biomonitoração de Hg, Cd, Pb e outros elementos em áreas costeiras do estado de São Paulo por meio do mexilhão transplantado Perna perna (Linnaeus, 1758)*. (2007) Tese de doutoramento - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

SHAKASHIRO, A. *Assignment of property value and associated uncertainty of reference materials*. In: REGIONAL TRAINING COURSE ON PREPARATION OF REFERENCE MATERIALS (Technical Cooperation Project RLA/2/014 - ARCAL XCVII, 2009-2011), 22-26 jun. 2009. Santiago, Chile.

SOUZA, V.; RODRIGUES, J. M.; BANDEIRA, R. D. C. C.; VALENTE, L. A. N.; SOUSA, M. V. B.; SILVA, V. F.; SILVA, R. A. L. Evaluation of the stability of ethanol in water certified reference material: measurement uncertainty under transport and storage conditions. *Accred. Qual. Assur.* v. 13, p. 717-721, 2008.

STEWART, E. M. Food irradiation chemistry. In; MOLINS, R. A. (Ed.). *Food Irradiation: Principles and applications*, 1 ed. New York, N.Y.: Wiley-Interscience, 2001. p. 37-76.

- TAGLIAFERRO, F. S.; FERNANDES, E. A. N.; BODE, P.; BACCHI, M. A.; FRANÇA, E. J. *Candidate coffee reference material for element content: production and certification scheme adopted at CENA/USP*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE METROLOGIA, 3^o, 01-05 set, 2003, Recife, PE: *Anais ...* Recife: SBM, CD-ROM., 2003.
- TRIOLA, M. F. *Introdução à estatística*. Tradução de FARIAS, A. A.; SOARES, E. F.; FLORES, V. R. L. F. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 1999.
- TIAN, W.; NI, B.; ZHANG, Y.; CAO, L.; WANG, P. Metrological role of neutron activation analysis. III. Role of INAA in sampling behavior characterization. *Accred. Qual. Assur.* v. 7, p. 101-105, 2002.
- THAYER, D. W.; JOSEPHSON, E. S.; BRYNJOLFSSON, A.; GIDDINGS, G. G. **Radiation pasteurization of food**, *Council Agricult. Sci. Tech., Issue Paper 7*, 1996.
- THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. The international harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories. (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* v. 78, n. 1, p. 145-196, 2006.
- USP, UNITED STATES PHARMACOPEIA 32, **Water determination**, General Method 921, National Formulary 27, v. 1, p. 388, 2009.
- WALSH, M. C. *Reference materials and accreditation: an international perspective*. In: BIOLOGICAL AND ENVIRONMENTAL REFERENCE MATERIALS SYMPOSIUM, 12th, 7-10 jul, 2009. Oxford, UK: *Presentations*. Disponível em: < <http://www.berm12.com/presentations.php> >. Acesso em: 18 out. 2009.
- WELZ, B; SPERLING, M. *Atomic Absorption Spectrometry*. 3. ed., Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 1999.
- WENDLANDT, W. W.; *Thermal analysis*, 3 ed., New York, N.Y.: Wiley-Interscience, 1986.
- WILLINK, R. What is robustness in data analysis? *Metrologia*, v. 45, p. 442-447, 2008.
- WYSE, E. J.; AZEMARD, S.; de MORA, S. J. *World-wide intercomparison exercise for the determination of trace elements and methylmercury in fish homogenate IAEA-406*. Mônaco: IAEA, 2003.
- WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION, *High dose irradiation: wholesomeness of food irradiated with doses above 10 kGy*, in: Report on a FAO, IAEA and WHO Joint Study Group on High Dose Food Irradiation, WHO Technical Report Series, 890, Geneva, 1999.
- YANG, L.; BANCON-MONTIGNY, C.; MESTER, Z.; SURGEON, R. E.; WILLIE, S. N.; BOYKO, V. J. Effects of γ -sterilization of butyltin homogeneity and content in sediments: a GC-ICP-MS study. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 376, p. 85-91, 2003.
- YOSHINAGA J.; MORITA, M. OKAMOTO, K. New human hair CRM for methylmercury and trace elements. *Fresenius J. Anal. Chem.*, v. 357 p. 279-283, 1997.
- ZEILLER, E.; BENEKTA, E.; KOLLER, M.; SCHORN, R. Dry mass determination: what role does it play in the combined measurement uncertainty? *Accred. Qual. Assur.* v. 12, p. 295-302, 2007.
- ZSCHUNKE, A. (Ed.) *Reference materials in analytical chemistry – a guide for selection and use*. Berlin, Springer, 2000.