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

**OTIMIZAÇÃO DA ANÁLISE POR ATIVAÇÃO NEUTRÔNICA INSTRUMENTAL
PARA O ESTUDO DE HOMOGENEIDADE DENTRO DO FRASCO DE MATERIAIS
DE REFERÊNCIA DE ORIGEM MARINHA**

DANIEL PEREIRA DA SILVA

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de Mestre
em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear –
Aplicações**

**Orientador:
Prof. Dr. Edson Gonçalves Moreira**

**SÃO PAULO
2017**

É com os olhos cheios de lágrimas que começo a redigir esse texto, dedicando este trabalho aos meus pais, Ademar Pereira & Carmelita Lima, pelo apoio dado em todos os momentos. Em especial, ao grande amor de minha vida, a minha mãe, que se foi de maneira tão repentina, faltando 23 dias para a conclusão deste trabalho, causando uma enorme lacuna em meu coração. Mãe você foi e sempre será tudo na minha vida, meu exemplo, meu orgulho, minha guerreira, minha heroína, minha conselheira e meu eterno amor. Fiz tudo nesta vida por ti e, me sinto honrado e agradecido a Deus pela oportunidade que ele me concedeu em tê-la como minha mãe. Palavras não me faltam para expressar o meu amor pela senhora, nunca irei te esquecer, te levarei em meu coração para o resto da minha vida como forma de saudade. Saudade esta que me faz manter vivo na esperança de reencontrá-la em outro tempo, lugar e dimensão. Choro de saudades, pois este sentimento por ti é muito grande, choro ao me recordar dos bons momentos, quando tivemos a oportunidade de vivê-los, o meu coração explode de amor. Lembro-me, das tuas mãos que me afagaram, dos teus abraços que diziam tudo, dos beijos dados e recebidos, do exemplo de trabalho, das determinações, das renúncias feitas, dos colos, dos sorrisos, das brincadeiras, dos conselhos sábios e carinhosos, do amor. Sinto o rolar das lágrimas pelo meu rosto, de gosto meio salgado, sendo elas fruto de bons sentimentos e lembranças, que temperaram com alegrias a nossa vida. Obrigado Deus pela mãe que tive e te agradeço por me fazer ter a sensibilidade de perceber desta forma, o desenrolar da vida, aceitando os seus caminhos, e seguir em frente com saudades. Minha eterna rainha, para sempre te amarei.

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, a Deus pela minha vida e por norteá-la, e em todos esses anos de pesquisa, conduzindo-me em todo o decorrer desse trabalho até a sua conclusão.

Aos meus pais Ademar Silva e Carmelita Lima por me incentivarem constantemente na realização deste trabalho. Vocês me ensinaram a andar, a brincar, a pensar. Vocês me ensinaram a sorrir, a respeitar, a agir. Me deram a base para construir a minha vida. E que base sólida eu tive! Hoje estou aqui, conquistando mais uma etapa. Etapa essa que seria muito difícil sem vocês. Obrigado pelo apoio, carinho, confiança e amor. Saibam, vocês são parte fundamental dessa conquista. Amo vocês.

A todos os meus familiares, em especial aos meus irmãos Denivaldo Silva, Claudinei Pereira, José Claudio e as minhas irmãs Valdirene Mendes, Claudia Costa e Denize Araújo, pelo apoio, mas também por compreenderem as inevitáveis ausências nos encontros familiares devido à distância e minha dedicação aos estudos. Amo vocês.

Ao meu orientador, Dr. Edson Gonçalves Moreira, pela paciência, empatia, dedicação, profissionalismo e confiança depositados em mim em todo o desenvolvimento dessa pesquisa. Pois sem o seu apoio, esse trabalho não teria sido possível de ser realizado e nem tão pouco concluído. Grato pelo privilégio e a oportunidade de ter trabalhado com você. Aqui lhe expresso toda a minha gratidão.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN – CNEN/SP), por abrir as portas ao desenvolvimento de novos alunos, disponibilizando os seus laboratórios para a concretização deste projeto. E aos meus colegas e amigos do LAN, cujos nomes prefiro não mencionar, pois são muitos e muito queridos. A cada um dedico este trabalho como forma de expressar a minha gratidão por toda contribuição e amizade que recebi na forma de incentivo.

À Dra. Mitiko Saiki, Dra. Vera Akiko Maihara, Dr. Paulo Sergio Cardoso da Silva, Dra. Maria José Aguirre Armelin (Tata) e à Dra. Marina Beatriz Agostini

Vasconcellos, por reconhecerem o meu esforço e dedicação neste projeto e pelas ideias sugeridas para melhoria do trabalho.

Agradeço ao Dr. Felipe Rebello Lourenço, pelo apoio e sugestões de melhoria quanto às análises de dados, indicando softwares apropriados.

Gostaria de expressar meus sinceros votos de gratidão a todos que também fizeram parte dessa etapa decisiva de minha vida, e que, de certa forma deram sua importante contribuição para que esse estudo se realizasse. Em especial, ao Wagner Nery, Dra. Erika Cristina, Célia Souto, Christian Satélis, Wellington Tappis, André Pedrosa, Patrícia Roehrs, Adriano Flores, Sheila Saraiva, Vanessa Menezes e Thomaz Freitas pelo apoio e total incentivo.

Agradeço também à empresa Pague Menos, em especial à Dra. Vanessa Mangini Francki pelo apoio e auxílio nas trocas de folgas que foram importantes para cursar as disciplinas obrigatórias.

A empresa CVS Health Drugstore Onofre, em especial a Dra. Amanda Costa pelo incentivo e ajuda prestada nos momentos finais desse trabalho, me transferindo para um local de trabalho mais próximo à Universidade de São Paulo, facilitando meu acesso à instituição e, conseqüentemente, favorecendo um melhor desempenho na pesquisa.

Grato ao casal Irmão José Benedito e Irmã Mariana Molnar pela residência alugada durante toda a minha estadia para realização do curso. Obrigado e Deus vos abençoe.

“Bem-aventurado aquele que teme ao Senhor e anda nos seus caminhos.
Pois comerás do trabalho das tuas mãos; feliz serás, e te irá bem”.

Salmos 128:1-2

This ain't a song for the broken-hearted
 Nor silent prayer for faith-departed
 I ain't gonna be just a face in the crowd
 You're gonna hear my voice
 When I shout it out loud

It's my life. It's now or never
 I ain't gonna live forever. I just want to live while I'm alive
 (It's my life). My heart is like an open highway
 Like Frankie said. I did it my way
 I just wanna live while I'm alive. It's my life

This is for the ones who stood their ground
 For Tommy and Gina who never backed down
 Tomorrow's getting harder make no mistake
 Luck ain't even lucky. Got to make your own breaks

It's my life. It's now or never
 I ain't gonna live forever. I just want to live while I'm alive (It's my life)
 My heart is like an open highway. Like Frankie said
 I did it my way. I just wanna live while I'm alive. It's my life

Better stand tall when they're calling you out
 Don't bend, don't break, baby, don't back down

It's my life. It's now or never
 I ain't gonna live forever. I just want to live while I'm alive. (It's my life)
 My heart is like an open highway. Like Frankie said
 I did it my way. I just wanna live while I'm alive. It's my life

It's my life. It's now or never
 I ain't gonna live forever
 I just want to live while I'm alive. (It's my life)
 My heart is like an open highway
 Like Frankie said. I did it my way
 Just wanna live while I'm alive. It's my life

It's my life – Bon Jovi
 Crush 2000

OTIMIZAÇÃO DA ANÁLISE POR ATIVAÇÃO NEUTRÔNICA INSTRUMENTAL PARA O ESTUDO DE HOMOGENEIDADE DENTRO DO FRASCO DE MATERIAIS DE REFERÊNCIA DE ORIGEM MARINHA

Daniel Pereira da Silva

RESUMO

A utilização de materiais de referência tem sido crescente em laboratórios químicos, uma vez que são importantes para a validação de métodos analíticos. Tais materiais são em geral importados, o que demanda altos investimentos financeiros para adquiri-los, e, portanto, impacta na não utilização dos mesmos por muitos laboratórios nacionais. A certificação de um material de referência é um processo complexo que pressupõe oferecer ao usuário valores atribuídos às propriedades de interesses no material. Neste processo, deve ser realizada a verificação da homogeneidade do material nos frascos. No presente estudo, foi realizado o estudo de homogeneidade dentro do frasco para os elementos K, Mg, Mn, Na e V em dois materiais de referência certificados de origem marinha: o material de referência de mexilhão, produzido no Laboratório de Ativação Neutrônica (LAN) do IPEN - CNEN/SP e o material de referência de tecido de ostra produzido no exterior. Para tanto, os elementos foram determinados por Análise por Ativação Neutrônica Instrumental, com massas variando entre 1 e 250 mg e estimou-se a massa mínima que variou de 0,015 g para Na no material de referência de mexilhão a 0,100 g para V nos dois materiais de referência.

OPTIMIZATION OF INSTRUMENTAL NEUTRON ACTIVATION ANALYSIS FOR THE WITHIN-BOTTLE HOMOGENEITY STUDY OF REFERENCE MATERIALS OF MARINE ORIGIN

Daniel Pereira da Silva

ABSTRACT

The use of reference materials has been increasing in chemical analysis laboratories as its use is important for measurement validation in analytical chemistry. Such materials are generally imported, which require high financial investments in order to acquire them, and therefore it impacts on the difficulty to many national laboratories to use reference materials in their chemical analysis routine. Certification of reference materials is a complex process that assumes that the user is given appropriate assigned values of the properties of interests in the material. In this process, the homogeneity of the material must be checked. In this study, the within-bottle homogeneity study for the elements K, Mg, Mn, Na and V was performed for two reference materials of marine origin: the mussel reference material produced at the Neutron Activation Laboratory (LAN) of IPEN - CNEN/SP and an oyster tissue reference material produced abroad. For this purpose, the elements were determined in subsamples with masses varying between 1 and 250 mg by Instrumental Neutron Activation Analysis (INAA) and minimum sample intakes were estimated, ranging from 0.015 g for Na in the mussel reference material to 0.100 g for V in the two reference materials.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 A importância da utilização de Materiais de Referência (MR) e Materiais de Referência Certificados (MRC).....	17
1.2 O estudo de homogeneidade em MR.....	19
2 OBJETIVO.....	22
3 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE OS ELEMENTOS ANALISADOS.....	23
3.1 Potássio.....	23
3.2 Magnésio.....	24
3.3 Manganês.....	24
3.4 Sódio.....	24
3.5 Vanádio.....	25
4 ANÁLISE POR ATIVAÇÃO NEUTRÔNICA INSTRUMENTAL.....	26
4.1 Considerações gerais.....	26
4.2 Princípios do método.....	27
4.3 Limite de Detecção (L_D) e Limite de Quantificação (L_Q).....	29
5 ESTUDO DE HOMOGENEIDADE EM MATERIAIS DE REFERÊNCIA POR INAA.....	31
6 PARTE EXPERIMENTAL.....	35
6.1 Verificação da calibração dos instrumentos laboratoriais.....	35
6.1.1 Calibração dos pipetadores automáticos.....	35
6.1.2 Verificação da calibração do balão volumétrico	37
6.2 Preparo dos padrões de K, Mg, Mn, Na, e V.....	38
6.3 Materiais de referência certificados.....	38
6.3.1 Materiais utilizados.....	38
6.3.2 Preparo das subamostras do MRC de Mexilhão.....	39
6.3.3 Preparo das subamostras do MRC de tecido de ostra.....	40
6.3.4 Irradiação e medição das radiações gama induzidas.....	40
6.4 Ensaios preliminares com as subamostras de mexilhão.....	41
6.4.1 Irradiações das subamostras por 20 e 60 segundos.....	41
6.4.2 Determinação por análise por ativação neutrônica instrumental.....	43
6.5 Estudo de homogeneidade dentro do frasco para os MRCs de mexilhão e tecido de ostra.....	44

6.5.1 Massas e subamostras.....	44
6.5.2 Determinação das condições para a análise.....	45
6.5.3 Irradiações das subamostras.....	45
6.5.4 Determinação de K, Mg, Mn, Na e V.....	45
6.5.5 Obtenção e tratamento dos dados.....	46
7 RESULTADO E DISCUSSÃO.....	47
7.1 Verificação da calibração dos equipamentos laboratoriais.....	47
7.1.1 Verificação da calibração dos pipetadores automáticos.....	47
7.1.2 Verificação da calibração do balão volumétrico.....	47
7.2 Cálculos das massas dos padrões pipetados.....	48
7.3 Ensaios preliminares com as subamostras de mexilhão <i>Perna perna</i>	48
7.3.1 Irradiação por 20 segundos.....	48
7.3.2 Irradiação por 60 segundos.....	52
7.4 Limite de Detecção (L_D) e Limite de Quantificação (L_Q).....	56
7.5 Estudo de Homogeneidade dentro do frasco para o MRC de tecido de mexilhão.....	60
7.5.1 Determinação da massa mínima de amostra.....	75
7.6 Estudo de Homogeneidade dentro do frasco para o MRC de tecido de ostra.....	77
7.6.1 Determinação da massa mínima de amostra.....	90
8 CONCLUSÃO.....	94
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95

LISTA DE TABELA

TABELA 1 - Relação dos pipetadores Eppendorf e volumes calibrados

TABELA 2 - Radionuclídeos utilizados neste trabalho na determinação por INAA (CHU e col., 1999)

TABELA 3 - Tempo de irradiação x distância do detector

TABELA 4 - Massas do MRC de tecido de mexilhão e suas respectivas subamostras

TABELA 5 - Massas do MRC de tecido de ostra e suas respectivas subamostras

TABELA 6 - Calibração dos pipetadores Eppendorf

TABELA 7 - Resultado da verificação da calibração do balão volumétrico de 10 mL

TABELA 8 - Preparo dos padrões pipetados para INAA a partir de soluções Spex

TABELA 9 – Valores certificados para o MRC de mexilhão *Perna perna* (MOREIRA, 2010)

TABELA 10 - Limites de detecção, L_D e quantificação, L_Q para K, Mg, Mn, Na e V obtidos para INAA

TABELA 11 - Concentração de elementos obtida por INAA para massas diferentes de amostra, para o estudo de homogeneidade dentro do frasco (base úmida)

TABELA 12 - Dados da ANOVA para regressão linear para o estudo de homogeneidade no material de referência de mexilhão para o nível de significância α de 0,05

TABELA 13 - Análise de Variância para o teste de homogeneidade dentro do frasco para o material de referência de mexilhão para nível de significância α de 0,05

TABELA 14 - Estimativa de massa mínima do MR de mexilhão, obtida por INAA

TABELA 15 - Concentrações de elementos obtidas por INAA para massas diferentes de amostra de tecido de ostra, para o estudo de homogeneidade dentro do frasco (base úmida)

TABELA 16 – Valores certificados para o MRC de tecido de ostra, NIST SRM 1566b (NIST, 2000)

TABELA 17 - ANOVA para regressão linear ao estudo de homogeneidade no material de referência tecido de ostra para nível de significância α de 0,05

TABELA 18 - Análise de Variância para o teste de homogeneidade dentro do frasco para o MRC de tecido de ostra para nível de significância α de 0,05

TABELA 19 - Estimativa de massa mínima do MRC de tecido de ostra, obtida por INAA

TABELA 20 - Estimativa de massa mínima dos MRC, obtida por INAA

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – Aspectos do estudo de homogeneidade de um material de referência
- FIGURA 2 - Processo esquemático da formação de um radionuclídeo artificial empregado na técnica de INAA
- FIGURA 3 - Solução Padrão de Mg e Papel filtro Whatman nº 40
- FIGURA 4 – Tiras de papel de filtro Whatman nº 40 contendo solução de Mg
- FIGURA 5 - Seladora utilizada para o fechamento dos invólucros de padrões de Mg
- FIGURA 6 - Padrões de Mg prontos para serem utilizados
- FIGURA 7 – Frasco do MRC de tecido de mexilhão
- FIGURA 8 - Balança analítica Shimadzu Libror AEL - 40SM
- FIGURA 9 – Seladora dos invólucros de padrões e amostras
- FIGURA 10 – Imagem das subamostras do MRC de tecido de mexilhão em invólucros de polietileno
- FIGURA 11 - Imagem das subamostras do MRC de tecido de ostra em invólucros de polietileno
- FIGURA 12 – Sistemática da irradiação simultânea, das subamostras e dos padrões. (a) Verificação do lacre do coelho de polietileno (b) Coelho de polietileno contendo subamostra do MRC e padrão (c) Coelho inserido no sistema pneumático na Estação nº4 (d) Coelho sendo exposto a fluxo de nêutrons térmicos (e) Retorno do coelho á estação nº4 (f) Subamostras e padrões inseridos em recipiente de alumínio, selado com fita adesiva e identificados (g) Subamostra e os padrões inseridos na prateleira do espectrômetro para análise (h) Medições dos radionuclídeos, utilizando o programa de espectroscopia Canberra Genie 2000 versão 3.2
- FIGURA 13 – Concentração do K obtido em várias massas de amostra do MRC de tecido de mexilhão em diferentes distâncias do detector com irradiação de 20s
- FIGURA 14 – Concentração do Mg obtido em várias massas de amostra do MRC de tecido de mexilhão em diferentes distâncias do detector com irradiação de 20s
- FIGURA 15 – Concentração do Mn obtido em várias massas de amostra do MRC de tecido de mexilhão em diferentes distâncias do detector com irradiação de 20s
- FIGURA 16 – Concentração do Na obtido em várias massas de amostra do MRC de tecido de mexilhão em diferentes distâncias do detector com irradiação de 20s
- FIGURA 17 – Concentração do V obtido em várias massas de amostra do MRC de tecido de mexilhão em diferentes distâncias do detector com irradiação de 20s

FIGURA 18 – Concentração do K obtido em várias massas de amostra do MRC de tecido de mexilhão em diferentes distâncias do detector com irradiação de 60s

FIGURA 19 – Concentração do Mg obtido em várias massas de amostra do MRC de tecido de mexilhão em diferentes distâncias do detector com irradiação de 60s

FIGURA 20 – Concentração do Mn obtido em várias massas de amostra do MRC de tecido de mexilhão em diferentes distâncias do detector com irradiação de 60s

FIGURA 21 – Concentração do Na obtido em várias massas de amostra do MRC de tecido de mexilhão em diferentes distâncias do detector com irradiação de 60s

FIGURA 22 – Concentração do V obtido em várias massas de amostra do MRC de tecido de mexilhão em diferentes distâncias do detector com irradiação de 60s

FIGURA 23 - Limites de Detecção, L_D para os elementos K, Mg e Na

FIGURA 24 - Limites de Quantificação, L_Q para os elementos K, Mg e Na

FIGURA 25 - Limites de Detecção, L_D para os elementos Mn e V

FIGURA 26 - Limites de Quantificação, L_Q para os elementos Mn e V

FIGURA 27 - Concentração de K em função das massas de mexilhão

FIGURA 28 - Concentração de Mg em função das massas de mexilhão

FIGURA 29 - Concentração de Mn em função das massas de mexilhão

FIGURA 30 - Concentração de Na em função das massas de mexilhão

FIGURA 31 - Concentração de V em função das massas de mexilhão

FIGURA 32 - Tendência dos resultados no estudo de homogeneidade dentro do frasco de K para o MRC de mexilhão: a) Resultados apresentados por ordem de medição; b) e c) resultados apresentados por ordem de massas

FIGURA 33 - Tendência dos resultados no estudo de homogeneidade dentro do frasco de Mg para o MRC de mexilhão: a) Resultados apresentados por ordem de medição; b) e c) resultados apresentados por ordem de massa

FIGURA 34 - Tendência dos resultados no estudo de homogeneidade dentro do frasco de Mn para o MRC de mexilhão: a) Resultados apresentados por ordem de medição; b) e c) resultados apresentados por ordem de massa

FIGURA 35 - Tendência dos resultados no estudo de homogeneidade dentro do frasco de Na para o MRC de mexilhão: a) Resultados apresentados por ordem de medição; b) e c) resultados apresentados por ordem de massa

FIGURA 36 - Tendência dos resultados no estudo de homogeneidade dentro do frasco de V para o MRC de mexilhão: a) Resultados apresentados por ordem de medição; b) e c) resultados apresentados por ordem de massa

FIGURA 37 - Comparação das médias das concentrações obtidas para o K no MRC de Mexilhão. (a) Não há diferença; (b) e (c) Há diferença

FIGURA 38 - Resultado do Teste de Tukey. Comparação das médias das concentrações obtidas para o Mg, Mn, Na e V no MRC de Mexilhão. (a): significa que todos pertencem ao mesmo grupo e, portanto, não há diferença

FIGURA 39 - Desvio padrão relativo em função da massa para o estudo de homogeneidade dentro do frasco para o MR de mexilhão. Estimativa do desvio padrão de repetibilidade do método (.....)

FIGURA 40 - Concentração do K em função das massas de Oyster, 5 a 100 mg

FIGURA 41 - Concentração do Mg em função das massas de Oyster, 25 a 100mg

FIGURA 42 - Concentração do Mn em função das massas de Oyster, 1 á 100 mg

FIGURA 43 - Concentração do Na em função das massas de Oyster, 1 a 100 mg

FIGURA 44 - Concentração do V em função das massas de Oyster, 50 á 100 mg

FIGURA 45 - Tendência dos resultados no estudo de homogeneidade dentro do frasco de K para o MRC de tecido de ostra: a) Resultados apresentados por ordem de medição; b) resultados apresentados por ordem de massa

FIGURA 46 - Tendência dos resultados no estudo de homogeneidade dentro do frasco de Mg para o MRC de tecido de ostra: a) Resultados apresentados por ordem de medição; b) resultados apresentados por ordem de massa

FIGURA 47 - Tendência dos resultados no estudo de homogeneidade dentro do frasco de Mn para o MRC de tecido de ostra: a) Resultados apresentados por ordem de medição; b) resultados apresentados por ordem de massa

FIGURA 48 - Tendência dos resultados no estudo de homogeneidade dentro do frasco de Na para o MRC de tecido de ostra: a) Resultados apresentados por ordem de medição; b) resultados apresentados por ordem de massa

FIGURA 49 - Tendência dos resultados no estudo de homogeneidade dentro do frasco de V para o MRC de tecido de ostra: a) Resultados apresentados por ordem de medição; b) resultados apresentados por ordem de massa

FIGURA 50 - Resultado do Teste de Tukey. Comparação das médias das concentrações obtidas para o K, Mg, Mn, e V no MRC de tecido de ostra (a): significa que todos pertencem ao mesmo grupo e, portanto, não há diferença

FIGURA 51 - Comparação das médias das concentrações obtidas para o Na no MRC de Mexilhão. (a) não há diferença; (b) há diferença

FIGURA 52 - Desvio padrão relativo em função da massa para o estudo de homogeneidade dentro do frasco para o MR de tecido de ostra. Estimativa do desvio padrão de repetibilidade do método (.....)

1 INTRODUÇÃO

Em química, antes de um trabalho laboratorial ser realizado, deve-se fazer o seguinte questionamento: quais as normas que devem ser seguidas para se obter resultados analíticos com alto grau de confiabilidade? Isto é, demonstrando os resultados com todas as fontes de incertezas associadas? As normas são utilizadas para padronizar procedimentos e indicar um padrão de qualidade para resultados analíticos. A qualidade é definida como o grau em que um conjunto de características inerentes satisfaz a requisitos e, portanto, é requisito essencial na garantia da qualidade (ABNT, 2012). Para ZSCHUNKE (2000), a confiabilidade nos resultados analíticos se faz cada vez mais importante em todas as áreas da química analítica, uma vez que esta pode afetar decisões econômicas, políticas e de proteção ao meio ambiente e à saúde.

Neste contexto, a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) e a Organização Internacional para Padronização (ISO) tornam-se pertinentes no desenvolvimento de um trabalho laboratorial. Elas evitam conflitos entre laboratórios, o que facilita a cooperação dos mesmos e de outros organismos, auxiliando na troca de informação e experiência, e na harmonização de normas e procedimentos. A ABNT é o Foro Nacional de Normalização, por reconhecimento da sociedade brasileira, uma entidade privada e sem fins lucrativos, responsável pela elaboração das Normas Brasileiras (ABNT NBR), já a ISO é responsável por organizar normas internacionais de todos os setores (ABNT, 2012). No caso de medições e análises químicas, é conveniente a utilização dessas normas, uma vez que, se a metodologia e a padronização de técnicas e procedimentos sugeridos pelos dois organismos (ABNT e ISO) forem cumpridas rigorosamente, asseguram ao analista a qualidade na pesquisa aplicada e consequentemente a obtenção de resultados com confiabilidade. Incluem-se neste tema a utilização de material de referência (MR) e quando possível material de referência certificado (MRC) que é um dos requisitos necessários para garantir a confiabilidade de resultados analíticos (CARDOSO, 2008).

1.1 A importância da utilização de Materiais de Referência (MR) e Materiais de Referência Certificados (MRC)

Dada a importância das normas serem procedentes de um organismo de autoridade, torna-se fundamental utilizá-las, bem como fazermos uso de MR, para obtermos resultados analíticos em pesquisa aplicada, com alto grau de confiabilidade. Assim, o uso de MR e quando possível de MRC é de suma importância na garantia dos resultados (ABNT, 2000). Neste âmbito, a ABNT NBR ISO/IEC 17025 recomenda a utilização do MR na pesquisa aplicada, pois este tem a sua aplicação na calibração, na validação de métodos, no controle da qualidade e na verificação do uso correto de um método (ABNT, 2005).

Um MR é um material ou substância suficientemente homogêneo e estável em relação a uma ou mais propriedades especificadas, o qual foi estabelecido como adequado ao uso pretendido em um processo de medição. As propriedades podem ser quantitativas ou qualitativas, por exemplo, identidade de substâncias ou espécies. Os usos pretendidos também podem incluir avaliação de um procedimento de medição, validação de métodos e incerteza da medição, verificação do uso correto de um método, calibração, controle de qualidade e garantia da qualidade, valores designados ou outros materiais e, além disso, o MR pode ser usado para um único propósito em uma dada medição, isto é, para verificar que em uma dada medição, um dado material de referência pode ser utilizado apenas para calibração ou para garantia da qualidade (ABNT, 2012).

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 confiabilidade metrologicamente apropriado e que estejam suficientemente documentados, 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, 2000).

A rastreabilidade é um fator de grande relevância em estudos que envolvem os MRCs, pois destacam as propriedades do resultado de uma medição ou do valor de um padrão estarem relacionados a referências estabelecidas, geralmente a padrões nacionais ou internacionais, através de uma cadeia

continua de comparações, todas tendo incertezas estabelecidas (INMETRO, 2009).

Para MEYERS (2000), a importância da utilização de MR de qualidade também é um fator importante, e, portanto, não deve ser negligenciado. Ele afirma que a qualidade do MR tem influência direta sobre a credibilidade dos resultados analíticos gerados em laboratórios. Particularmente na pesquisa aplicada, é crucial que o MR ou MRC em análise sejam de qualidade e se possível, proveniente de um laboratório que contenha certificado concebido por um organismo com autoridade.

Os MRs geralmente são caracterizados baseados na exatidão de todo o processo experimental e, desse modo, o valor certificado da propriedade representa a melhor estimativa do valor verdadeiro. A incerteza declarada desse valor da propriedade deve levar em consideração todos os efeitos aleatórios e sistemáticos inerentes ao processo de medição, bem como a variabilidade entre as amostras (homogeneidade) e o tempo de validade do material (estabilidade) (ABNT, 2012).

Eventualmente, os MRs são utilizados por algumas empresas ou indústrias com o propósito de comparar lotes futuros de produção, visando avaliação da homogeneidade e da estabilidade do produto ao longo do tempo. Muitas vezes são escolhidos lotes de produtos, e deste, retirados de maneira aleatória um número significativo de frascos, em torno de 10, e realizadas tais comparações, para averiguar se os produtos apresentam às propriedades físicas ou químicas correspondentes as especificações do certificado. Assim, determinar a homogeneidade do MRC é um dos fatores essenciais para a garantia da manutenção das propriedades físico-químicas do material estudado e, portanto, as dimensões da amostra devem ser representativas ao tamanho do grupo (ABNT, 2012).

Devido à importância da utilização de MRCs em sistemas de qualidade para medições químicas e dificuldades tais como alto custo e dificuldade de aquisição de tais materiais, a maioria é importada e, à pequena disponibilidade de MRCs nacionais, impossibilitam à sua utilização por laboratórios nacionais em sua rotina, fica evidente a relevância de iniciativas que capacitem laboratórios nacionais para a produção de tais materiais, e neste item inclui-se o teste de homogeneidade.

O Laboratório de Análise por Ativação Neutrônica (LAN) do Centro do Reator de Pesquisas (CRPq) do IPEN - CNEN/SP tem experiência na produção de MRs. Já foram produzidos um MRC de mexilhão e um MRC de tecido de peixe, com apoio de órgãos de fomento nacionais (VASCONCELLOS, 2007, 2008; MOREIRA, 2010, 2011) e da Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA, 2009). Atualmente outras investigações nesta área estão em desenvolvimento pelos pesquisadores do LAN.

1.2 O estudo de homogeneidade em MR

No desenvolvimento de um MRC é importante que ocorra uma cadeia de registro de dados em todo o decorrer do processo. Desta forma, o analista estará contribuindo para a garantia da qualidade dos seus resultados e, conseqüentemente, do produto. Assim, o uso de MRCs também garante que os princípios para estabelecer a exatidão não sejam omitidos, minimizando a ocorrência de erros (ILAC, 2000; CHUI e col., 2005; ABNT, 2012).

Basicamente, são quatro etapas de trabalho para a produção de um MRC: preparo do material; envase das amostras, com verificação da homogeneidade do material nos frascos; estabelecimento da estabilidade, que garantirá ao material embalado ser mantido íntegro durante estocagem por tempo pré-estabelecido e a certificação dos valores atribuídos às propriedades de interesse do material preparado. A embalagem desse material também tem relevância, pois irá contribuir para manter sua integridade durante todo o período despendido no transporte e armazenamento. O valor de propriedade certificado dos materiais de referência deve ser mensurado a partir de cálculos estatísticos adequados e informado com suas incertezas devidamente estimadas, provenientes da caracterização da amostra, da homogeneidade e da estabilidade da mesma (ILAC, 2000; CHUI e col., 2005; ABNT, 2012).

Um MR é considerado homogêneo em relação a uma determinada propriedade, se a diferença entre os valores desta propriedade entre as diferentes porções do material é desprezível se comparada com uma das componentes de incerteza de caracterização do material. A homogeneidade é definida como o grau com que uma propriedade é aleatoriamente distribuída pelo material. Isto significa que, diferentes subamostras de um material têm a mesma composição química apenas dentro de certos limites de confiança (ABNT, 2012).

Como parte importante na caracterização de um MR, faz-se necessário a realização do estudo da homogeneidade do material nos frascos, fundamental para que seja observado se há diferenças significativas ao longo do lote do material, além de determinar qual a massa mínima da amostra para determinada utilização (ABNT, 2012).

A apresentação da sistemática para o estudo de homogeneidade do material pode ser encontrada no ABNT ISO Guia 35 (2012). Segundo este guia, o estudo de homogeneidade é necessário na certificação de um lote de MR para demonstrar que as unidades deste lote são suficientemente homogêneas entre si. Na prática um MR só é suficientemente homogêneo quando seus diversos frascos não diferem entre si o bastante para afetar seus usos.

A FIG. 1 apresenta os dois tipos de estudos que são realizados para se avaliar a homogeneidade de um MR. A primeira abordagem é o estudo de homogeneidade entre frascos, que é utilizado para verificar se há diferença observada entre os diversos frascos do lote do material. Sendo também utilizado na estimativa da contribuição da heterogeneidade residual para a incerteza dos valores certificados (u_{bb}). A segunda abordagem é o estudo de homogeneidade dentro dos frascos, cujo objetivo é determinar a massa mínima de amostra necessária para determinado propósito. Por definição, a massa mínima é a menor alíquota do MR que deve ser utilizada para que as informações do certificado possam ser consideradas válidas (ABNT, 2012).

FIGURA 1 – Aspectos do estudo de homogeneidade de um material de referência

Para o estudo de homogeneidade do MR dentro do frasco, os elementos de interesse são determinados utilizando-se diferentes massas e para cada massa escolhida, um número fixo de subamostras é analisado em replicata.

A técnica estatística de Análise de Variância (ANOVA) é então utilizada para se determinar a variabilidade presente dentro do frasco em função das massas utilizadas. Para a análise dos resultados, valores extremos são eliminados e os conjuntos de dados são testados quanto à normalidade, utilizando-se em geral o teste de Shapiro-Wilk a 95 % de confiança.

Uma vez que o desvio padrão de repetibilidade 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 (ABNT, 2012).

Os MRs de origem marinha, entre eles tecido de mexilhão e ostras, são utilizados constantemente em pesquisa aplicada, bem como no biomonitoramento ambiental aquático. Os moluscos bivalves, como mexilhões e ostras são marcadores traços biológicos, são organismos sedentários, estão em contato próximo com a água, alimentam-se por filtração da água e podem vir a acumular em seus tecidos diversos poluentes, isto é, grande quantidade de substâncias químicas, resíduos orgânicos e inorgânicos, e microrganismos presentes na água (GOSLING, 2003).

Os agentes que podem ser veiculados são de natureza biológica (bactérias, vírus, parasitas e toxinas de moluscos) e química (elementos tóxicos, resíduos de pesticidas e, mais raramente, antibióticos, quando se trata de cultivo/criação) (MORAES, 2000). Assim, a concentração desses elementos presentes na água e nos tecidos desses organismos, reflete as condições ambientais em que vivem, podendo o seu consumo trazer sérios danos ao organismo humano, representando um risco à saúde pública, uma vez que alguns moluscos chegam a filtrar até 100 litros de água por dia (DAME, 1996).

Lamentavelmente, não existem MRs para todas as análises químicas realizadas atualmente em laboratórios. Somente estão disponíveis MRs para as técnicas analíticas mais rotineiramente empregadas e para um número relativamente pequeno de matrizes.

2 OBJETIVO

Determinar por Análise por Ativação Neutrônica Instrumental (INAA) a homogeneidade dentro do frasco do MRC de tecido de mexilhão *Perna perna*, produzido no Laboratório de Ativação Neutrônica (LAN) do IPEN - CNEN/SP e do material de referência tecido de ostra produzido pelo Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST) localizado em Gaithersburg, EUA, ambos MRCs de origem biológica marinha.

Para tanto, a potencialidade da técnica de Análise por Ativação Neutrônica Instrumental (INAA) e as melhores condições para analisar amostras biológicas de origem marinha utilizando massas mais baixas e mais altas do que usualmente é utilizado serão investigadas.

Para realização dos estudos de homogeneidade dentro do frasco, serão quantificados os elementos K, Mg, Mn, Na e V em subamostras dos materiais mencionados. No caso do material de referência de mexilhão, as massas propostas variam entre 1 e 250 mg enquanto para o material de referência de tecido de ostra, massas variando entre 1 e 100 mg.

A partir dos resultados de concentração obtidos, serão estimadas massas mínimas dos materiais de referência que devem ser utilizadas para determinação de cada um dos elementos analisados no estudo.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE OS ELEMENTOS ANALISADOS

Neste estudo foram determinados os elementos K, Mg, Mn, Na e V. Os radionuclídeos desses elementos apresentam meias vidas relativamente curtas, o que favorece a sua determinação em materiais biológicos por INAA em irradiações rápidas, utilizando-se estação pneumática para tanto. Todos esses elementos são essenciais à saúde e, portanto, sua falta ou excesso pode causar prejuízos à saúde. Tais elementos estão presentes em alimentos de origem marinha, sendo desta forma, relevante conhecer as suas concentrações em mexilhão e ostras. Nos itens a seguir são apresentadas algumas características importantes desses elementos.

3.1 Potássio

Do ponto de vista nutricional, o elemento potássio é de extrema importância para o bom funcionamento do organismo humano. Ele pode ser encontrado em diversos alimentos de origem animal e vegetal, bem como em mexilhões e em ostras. Das funções deste elemento, destacam-se a atuação no balanço e distribuição da água no organismo, age no relaxamento muscular, tem atuação na manutenção do equilíbrio ácido-base e participa dos processos de regulação das atividades neuromusculares. Tanto a falta quanto o excesso deste mineral no organismo humano trazem problemas à saúde. A falta de potássio pode causar distensão abdominal, câibras, vômitos, dispneia, sensação de formigamento na pele e arritmias cardíacas. Já o excesso deste, ocasiona distúrbios cardíacos, acidente vascular cerebral, alterações nas movimentações musculares e confusão mental. É fundamental que o K seja inserido na dieta dos seres humanos, para que não ocorra deficiência e nem tão pouco o excesso deste elemento. Além disso, muitos estudos sugerem que o K possui papel fundamental na otimização da saúde óssea (WEBER, 2001).

3.2 Magnésio

O magnésio é um nutriente essencial para a saúde e para a vida. Participa em mais de 300 reações no organismo por isso, a sua falta não passará despercebida e pode comprometer muito uma vida que se quer saudável. A concentração desse elemento no organismo deve ser continuamente regulada e a distribuição para as células precisa ser garantida. O Mg intracelular é cofator de enzimas que participam do metabolismo dos carboidratos, pois ativa o complexo ATP-Mg, regulando todas as reações de fosforilação. Na deficiência de Mg, ocorrem alterações na atividade da tirosina quinase sobre o receptor de insulina, fato esse relacionado ao desenvolvimento da resistência à insulina pós-receptor e à redução na utilização de glicose (BARBAGALLO, 2001).

Segundo VORMANN e ANKE (2002), o valor máximo de ingestão diária desse elemento é de cerca de 400 mg.

3.3 Manganês

Os seres vivos necessitam de pequenas quantidades de alguns elementos, como cobalto, cobre, manganês, molibdênio, vanádio, estrôncio e zinco, para a realização de funções vitais no organismo. Porém níveis excessivos desses elementos podem ser extremamente tóxicos. Particularmente, o Mn é um elemento que está presente em pequenas quantidades em nosso corpo. Ele é considerado um nutriente essencial e é responsável por inúmeras funções biológicas, incluindo o funcionamento adequado de enzimas, a cicatrização de feridas, a absorção de nutrientes e o desenvolvimento ósseo. Diante disso, nota-se que a ingestão excessiva de alimentos que contenham Mn pode levar, entre outros efeitos, a baixo crescimento, defeitos ósseos, redução da fertilidade, intolerância à glicose e alterações no metabolismo de lipídios e carboidratos (NAP, 2001).

3.4 Sódio

Este elemento químico também é necessário para o funcionamento apropriado do organismo. O corpo humano precisa do Na para regular a pressão sanguínea e o volume de sangue. Além disso, também ajuda no funcionamento adequado de músculos e de nervos. A deficiência de Na é rara, sendo geralmente observadas dietas excessivas do elemento, isto é, dietas com altas concentrações

presentes nos alimentos consumidos por uma pessoa. O excesso de Na pode contribuir para a elevação da pressão sanguínea. Todavia, grande retenção líquida ou a constante perda pode levar a baixa concentração de sódio, definida como hiponatremia, cujos sintomas incluem dor de cabeça, náusea, vômito, câibra muscular, fadiga e desorientação. Diversas evidências experimentais sugerem que o risco de desenvolvimento de neoplasias aumenta com o consumo de alimentos industrializados ou demasiadamente salgados (TSUGANE, 2005). Recomenda-se a ingestão de sódio de menos de 2 g/dia para o indivíduo adulto (WHO, 2012).

3.5 Vanádio

O vanádio é elemento traço essencial, pertencente ao grupo de elementos de transição (MARZBAN e McNEILL, 2003). Ele pode estar presente no mar e, em determinadas concentrações, em peixes e moluscos. Aparentemente o V tem papel importante no metabolismo da epinefrina, da norepinefrina e da dopamina. Por esta razão, suspeita-se que os níveis de V no organismo humano estão diretamente correlacionados às condições irregulares das funções cerebrais, como nas psicoses. Assim, por exemplo, a desordem bipolar e os estados maníaco depressivos estariam ligados a níveis elevados de vanádio no sistema circulatório.

A determinação deste elemento em organismos marinhos é de grande relevância devido à sua toxicidade, uma vez que há um alto consumo de alimentos de origem marinha. Para LUZ e col., (2003), a maioria dos efeitos tóxicos deste elemento ocasionam ação irritativa local dos olhos e do trato respiratório superior, bem como rinite, hemorragia nasal, bronquite e dor torácica.

Por outro lado KIMURA e col., (2006) e HAMEL e col., (1993), afirmaram que o V tem potencial terapêutico no combate ao diabetes mellitus, devido a seu efeito mimético da insulina. Estudos mostram também que este elemento pode ser utilizado como agente antitumoral no tratamento do câncer (EVANGELAU e col., 2002).

4 ANÁLISE POR ATIVAÇÃO NEUTRÔNICA INSTRUMENTAL

4.1 Considerações gerais

Em 1934, Irène e Frédéric Joliot-Curie, descobriram a reação de ativação, isto é, a obtenção de substâncias radioativas a partir do choque entre núcleos dos elementos com partículas ou núcleos de outros elementos. Já em 1936, Hevesy e Levi utilizaram nêutrons para bombardear disprósio e európio, sugerindo a aplicação do método de ativação com nêutrons em análises elementares (ALFASSI, 1990).

Desde a sua primeira aplicação, em 1936, a Análise por Ativação Neutrônica Instrumental (INAA) amadureceu como técnica para determinações elementares. Dois grandes impulsos marcam a sua história, o primeiro nas décadas de 50 e 60, com o surgimento e disseminação pelo mundo da tecnologia de reatores nucleares, e o segundo com a popularização dos detectores de germânio na década de 70, que tornou a INAA definitivamente uma técnica multielementar, como conhecida atualmente (ALFASSI, 1994).

Segundo BODE e GOEIJ (1998), a técnica apresenta alta sensibilidade, com exatidão aceitável, o que permite a determinação de vários elementos presentes numa mesma amostra. A técnica se baseia na produção de radionuclídeos artificiais a partir de elementos estáveis para sua análise qualitativa e quantitativa. As amostras são irradiadas sob fluxo de nêutrons provenientes de um reator nuclear, que interagem com os núcleos dos átomos dos elementos presentes na amostra, formando os radionuclídeos. Estes radionuclídeos decaem segundo a sua meia vida, emitindo os chamados raios gama de decaimento, os quais são medidos num espectrômetro de raios gama. A análise qualitativa consiste na identificação do elemento que deu origem a este radionuclídeo pela sua meia vida e pelas energias dos raios gama emitidos. A INAA possui como vantagens frente a outras técnicas analíticas, a utilização de massa pequena de amostra e a não necessidade de dissolução da mesma, tornando-se, assim, alternativa relevante para avaliar o grau de homogeneidade

de materiais de referência (ROSSBACH e GROBECKER, 1999; TIAN e col., 2002).

4.2 Princípios do método

A INAA é frequentemente utilizada para a determinação das concentrações de elementos presentes em diversas matrizes. É uma técnica de alta sensibilidade, multielementar, não destrutiva, podendo-se detectar ampla faixa de elementos mesmo em alíquotas pequenas (em torno de 50 a 200 mg) (EHMANN e VANCE, 1991).

Além dessas características, a técnica de INAA também é capaz de determinar elementos em níveis de $\mu\text{g kg}^{-1}$ até concentrações da ordem de %; e apresenta baixos limites de detecção (L_D) e de quantificação (L_Q) para 30 a 40 elementos. Entre as desvantagens da utilização desta técnica, podemos destacar: o tempo longo de análise, se comparado com técnicas espectroscópicas; a manipulação de amostras irradiadas, a geração de rejeito radioativo e a necessidade de um reator nuclear.

Em INAA, diversos fatores afetam os valores de L_D e L_Q . Desta forma, estes limites devem sempre ser apresentados associados às informações específicas do método utilizado, a matriz da amostra, as condições de irradiação, de decaimento e de medição, uma vez que são estimados a partir da estatística de contagem referente à radiação de fundo característica para a região de localização do pico correspondente do mensurando (GREENBERG e col., 2011).

Além disso, GREENBERG e col., (2011) afirmaram que tanto o L_D quanto o L_Q apresentam importante papel para a caracterização do desempenho para métodos de medição, pois através da compreensão destes dois fatores, é possível avaliar o potencial do método em detectar e quantificar os mensurandos na faixa de concentração requerida por um estudo ou legislação.

Devido às suas características, a INAA tem sido aplicada em diversas linhas de pesquisa, tais como em análises ambientais, estudos nutricionais, estudos relacionados à saúde, materiais geológicos e ciências dos materiais (IAEA, 2001; Silva, 2004; MOREIRA e col., 2007; FEI e col., 2010).

A FIG. 2 representa uma reação nuclear resultante da interação de um nêutron com um núcleo alvo, produzindo um núcleo composto, em estado excitado, que irá decair de acordo com a meia vida do nuclídeo formado, através

de uma variedade de formas. As atividades induzidas são determinadas por meio de detectores semicondutores que possuem grande capacidade para medir e discriminar as energias dos raios gama emitidos pelos núcleos excitados (MEYERS, 2000).

A intensidade da radiação emitida é proporcional à concentração do elemento na amostra e, uma vez que cada radionuclídeo produzido no processo de ativação possui características próprias de emissão (meia vida e energia das partículas ou radiação gama), é possível efetuar determinações por meio de comparação com a atividade medida entre amostras, materiais de referência certificados e padrões sintéticos (MOREIRA e col., 2007; FEI e col., 2010).

FIGURA 2 - Processo esquemático da formação de um radionuclídeo artificial empregado na técnica de INAA

Para determinar o teor dos mensurandos na produção de MRC, é fundamental utilizar o método comparativo, devido o seu alto grau de qualidade analítica. Este método consiste na irradiação da amostra e do padrão sintético de maneira simultânea, em uma mesma geometria de espaço e de fluxo de nêutrons. Após o período de decaimento apropriado, realiza-se a medição do espectro de raios gama para a amostra e para o padrão sintético numa mesma configuração de detecção e em um mesmo detector. A determinação da concentração do mensurando na amostra é calculada por meio da comparação da área dos fotopicos obtidos para amostra e para o padrão sintético (EHMANN e VANCE, 1991).

O método comparativo de INAA independe de parâmetros como a limitação para uma correta estimativa do fluxo de nêutrons incidentes na amostra e a sua correta estimativa, que é fundamental para o cálculo preciso da concentração, pois parte do princípio de que a relação entre a atividade da amostra e do padrão sintético depende unicamente da massa do mensurando. No método comparativo da INAA, utilizado neste trabalho, a concentração é determinada pela comparação das áreas dos picos, obtidos no espectro gama da amostra irradiada com as áreas dos picos dos mesmos elementos nos espectros dos materiais de referência que foram irradiados juntamente com as amostras. (GREENBERG e col., 2011).

Utiliza-se para o cálculo a Equação 1:

$$C_{ai} = \frac{(A_{ai}m_p C_{pi})e^{-\lambda(t_a-t_p)}}{A_{pi}m_a} \quad [1]$$

onde:

C_{ai} : Concentração do elemento i na amostra ($\mu\text{g g}^{-1}$ ou %);

C_{pi} : Concentração do elemento i no padrão ($\mu\text{g g}^{-1}$ ou %);

A_{ai} : Atividade do elemento i na amostra (cps);

A_{pi} : Atividade do elemento i no padrão (cps);

m_a e m_p : Massas da amostra e do material de referência, respectivamente (g);

λ : Constante de decaimento do radionuclídeo formado (min^{-1});

$t_a - t_p$: Diferença de tempo entre as medições da amostra e do padrão, respectivamente (min).

4.3 Limite de Detecção (L_D) e Limite de Quantificação (L_Q)

Quando são realizadas medições em amostras com baixos níveis de analito como em análise de traço, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito ou da propriedade que pode ser detectado pelo método. O L_D para um procedimento analítico, nesse caso, pode variar em função do tipo da amostra. É, portanto, fundamental assegurar-se de que todas as etapas de

processamento do método analítico sejam incluídas na determinação desse limite de detecção. O L_D é importante para verificar se a técnica analítica atende às necessidades da medição. Está relacionado ao valor mínimo que pode ser detectado por um método analítico (CURRIE, 1999).

É sabido que o L_D é a menor concentração de analito que pode ser detectada, não sendo necessariamente quantificada. Assim, outro limite é caracterizado por demonstrar na prática o menor valor de concentração de analito quantificado. Este limite é denominado de Limite de Quantificação (L_Q). O L_Q é a menor concentração de analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão especificadas (ICH, 1994).

Em INAA, 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 (MOREIRA, 2010).

Os L_D e L_Q foram estimados em contagem por segundo, seguindo-se o método proposto por CURRIE (1999), de acordo com as Equações 2 a 4. Posteriormente os valores em concentração foram obtidos a partir da equação da ativação neutrônica.

$$L_D = 3,29 \sigma_0 \quad [2]$$

$$L_Q = 10 \sigma_0 \quad [3]$$

$$\sigma_0 = \frac{\sqrt{RF}}{tv} \quad [4]$$

onde:

σ_0 é o desvio padrão;

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

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

5 ESTUDO DE HOMOGENEIDADE EM MATERIAIS DE REFERÊNCIA POR INAA

O grau de heterogeneidade é, com poucas exceções, inerente a qualquer material no estado sólido. Portanto, antes da certificação, materiais de referência são normalmente submetidos ao estudo de homogeneidade (ABNT, 2012). O objetivo principal do estudo de homogeneidade é verificar, em um número razoável de frascos, que todos os frascos do MR podem ser considerados como sendo "idênticos", isto é, que não há diferenças significativas entre os valores das propriedades certificadas de um frasco para os outros, quando está prevista a certificação de um lote do MR. Além disso, se o material não está preparado em porções para uso individual, é verificada a massa mínima de amostra que deve ser usada para que os valores das propriedades contidos no certificado continuem válidos. A variabilidade dos resultados do material é quantificada e incorporada à incerteza dos valores certificados como a incerteza padrão devida à homogeneidade entre frascos (u_{bb}) (ABNT, 2012).

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 INAA, técnica de referência para a avaliação do grau de homogeneidade de MRs (ROSSBACH e GROBECKER, 1999; TIAN e col., 2002).

Em trabalho de doutorado realizado no IPEN - CNEN/SP com MRC de mexilhão, foi observado a diminuição dos valores de concentração com o aumento da massa para diversos elementos analisados por INAA, em particular para os elementos com meia vida intermediária, tais como As e Na. Para elementos de meia vida mais longa, o fenômeno foi menos acentuado ou não esteve presente, como para Ag. Deste modo, foi verificada tendência nos resultados em função da massa que variou entre 50 e 500 mg (MOREIRA, 2010).

O fenômeno relaciona-se à limitação do método de INAA utilizado, possivelmente devido à medição com taxas de contagem elevadas, o que leva à elevação do tempo morto do espectrômetro de raios gama e ao incremento do

fenômeno de empilhamento de pulsos. Também podem ter ocorrido autoabsorção da radiação gama emitida pelas subamostras e influência da diferença na geometria das subamostras com massas maiores em relação aos padrões dos elementos.

O tempo morto é o tempo após cada evento em que o sistema de detecção não é capaz de registrar outro evento (LEO, 1994). Esta limitação é consequência direta dos processos físicos no detector ou das limitações de tempo no processamento da informação na eletrônica associada. As perdas por tempo morto podem ser muito importantes em taxas de contagem elevadas, assim, estas devem ser levadas em consideração e corrigidas para que sejam obtidas medições exatas (CARDOSO e col., 2004). Em taxas de contagem elevadas podem ocorrer perda de resolução, deslocamento de picos e erros na medição do tempo morto (GILMORE, 2008).

Outro problema em medições com altas taxas de contagem é o empilhamento de pulsos, que ocorre quando os pulsos chegam em tempo mais próximo que o tempo de resolução do sistema que, então, não pode medir a área dos picos corretamente. Dois pulsos podem ser registrados como um evento único, no processo denominado empilhamento de picos. Os eventos são registrados em canais de energia errados e o espectro apresenta resultados incorretos (GILMORE, 2008; ZEISLER, 2000).

De maneira geral, opta-se por trabalhar com taxas de contagem as mais baixas possíveis, de forma que o tempo morto não exceda, em geral 10 a 15%. Isso é obtido irradiando-se a amostra o menos possível, medindo a amostra longe do detector ou ainda deixando a amostra decair por período adequado de tempo. No entanto, em muitas situações que utilizam INAA, particularmente para amostras ambientais, as taxas de contagem podem ser naturalmente elevadas. Além disso, em medições de amostras com núclídeos com tempos de meia vida muito curtos pode ser necessário trabalhar em taxas de contagem elevadas. Em outros casos, ao se medir raios gama de intensidade muito baixa na presença de alta atividade da matriz, deve-se medir a radiação emitida pela amostra por tempo suficiente para que se tenha confiança estatística nos resultados (GILMORE, 2008).

E, finalmente, algumas vezes pode-se optar propositadamente pela medição em taxas de contagem elevadas para aumentar o número de amostras

medidas no mesmo tempo por razões econômicas ou para aumentar a competitividade da INAA frente a outras técnicas analíticas. Neste caso, devem-se utilizar métodos adequados para correção de tempo morto ou utilização de equipamentos dotados de sistemas de contagem sem perdas de picos ou de sistemas desenvolvidos para medição a altas taxas de contagem (ZEISLER, 2000; YI e col., 2005; GILMORE, 2008).

No trabalho de doutorado citado acima, além do problema referente à determinação de elementos por INAA com massas elevadas de amostra, foram estimados valores de massa mínima como 50 mg para grande número de materiais e se observou que, possivelmente, esses resultados foram superestimados e que valores inferiores de massa mínima possam ser obtidos por INAA, o que pode ser verificado experimentalmente com utilização de massas inferiores a 50 mg no estudo de homogeneidade dentro do frasco (MOREIRA, 2010).

Em geral, os MRC disponíveis no mercado são certificados para utilização com massa mínima de amostra entre 100 e 200 mg. A massa mínima é a menor alíquota do MRC que deve ser utilizada para que as informações do certificado possam ser consideradas válidas (ABNT, 2012). Em técnicas analíticas que utilizam massas bem menores de amostra, tais MRCs não podem ser utilizados de forma adequada, uma vez que não foram desenvolvidos para este fim. Assim, se observa na literatura interesse pela produção de MRCs com massas mínimas de amostra mais baixas e também o desenvolvimento de métodos para determinação da microhomogeneidade de materiais (PAUWELS e col., 2001; ROSSBACH e GROBECKER, 1999). A técnica de Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica com Amostragem Direta de Sólidos (SS ET AAS) é um exemplo típico de tais técnicas (ZMOZINSKI e col., 2013; NOMURA e col., 2005). Também podem ser citadas as técnicas de Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado e Ablação por Laser (LA ICP-MS) e Espectroscopia de Plasma Induzido por Laser (LIBS) (DONG e col., 2011; RUSAK e col., 1998) e no caso específico do mercúrio, o equipamento para determinação direto de mercúrio que, apesar de usualmente trabalhar com 100 mg de amostra, pode determinar mercúrio em amostras com massa bastante inferiores (LECO, 2008).

Assim, no presente trabalho, a influência da medição em taxas de contagem elevadas deve ser levada em consideração para subamostras de massas também elevadas (maior que 200 mg). No extremo oposto, ao se trabalhar com massas pequenas de amostra, isto é, massa inferior a 20 mg será necessário investigar a potencialidade da técnica de INAA no que se refere a problemas relacionados aos limites de detecção e geometria da amostra. Neste último caso, pode-se avaliar o uso de pastilhas ou a dissolução da amostra previamente à irradiação.

6 PARTE EXPERIMENTAL

6.1 Verificação da calibração dos instrumentos laboratoriais

A utilização de equipamentos e instrumentos utilizados em pesquisas científica devem possuir o certificado de calibração emitido por um organismo de autoridade. Portanto, antes da realização do estudo de homogeneidade, foi verificada a calibração dos instrumentos laboratoriais: os pipetadores (Eppendorf) e o balão volumétrico da marca Pyrex. Além disso, a balança analítica Shimadzu Libror AEL - 40SM, usada para pesar as amostras, foi previamente calibrada por laboratório acreditado pela Rede Brasileira de Calibração (RBC). Esta verificação da calibração é requisito da norma ABNT NBR ISO/IEC 17025, visando a garantia de que o equipamento utilizado atende às condições descritas pelo certificado de calibração (ABNT, 2012).

6.1.1 Calibração dos pipetadores automáticos

A calibração dos pipetadores Eppendorf foi realizada com o auxílio de béquer, água ultrapura (Milli-Q), termômetro e balança analítica modelo Libror AEL- 40SM. O procedimento consistiu em tarar a balança, colocar o béquer vazio na mesma, tarar novamente, pipetar água Milli-Q na quantidade de interesse, fechar a balança e anotar o resultado. Para cada volume, o processo foi repetido 10 vezes, usando a densidade da água na temperatura média para obter o volume e, os resultados das medições analíticas, utilizados para fazer os cálculos das massas pipetadas e obtenção do desvio padrão (DP), do desvio padrão relativo porcentual (DPR (%)) e do erro relativo porcentual (ER (%)), de acordo com as Equações 5 a 7:

$$DP = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad [5]$$

onde:

DP = desvio padrão;

x_i = valor da massa obtida na medição i ;

$\bar{x}$ = média aritmética das massas;

n = número de replicatas.

$$DPR(\%) = \frac{DP \cdot 100}{\bar{x}} \quad [6]$$

onde:

$DPR(\%)$ = desvio padrão relativo percentual;

DP = Desvio padrão;

$\bar{x}$ = Média das massas.

$$ER(\%) = \frac{100(x - x_v)}{x_v} \quad [7]$$

onde:

$ER(\%)$ = é o erro relativo percentual;

x = é o resultado médio da medição do volume;

x_v = é o valor de referência do volume (valor nominal).

A TAB. 1 apresenta a relação dos pipetadores Eppendorf utilizados. Os volumes nominais verificados foram 25 a 2500 μL .

TABELA 1 - Relação dos pipetadores Eppendorf e volumes calibrados

Pipetador	Série	Volume Nominal (μL)
10-100 μL	169020Z	25
10-100 μL	169020Z	50
10-100 μL	169020Z	100
100-1000 μL	4580119	500
100-1000 μL	4580119	1000
1-10 mL	4356529	2500

6.1.2 Verificação da calibração do balão volumétrico

Um balão volumétrico Pyrex, de volume nominal de 10 mL (ALR 6830/10), foi verificado quanto à calibração. Com auxílio de béquer, água ultrapura (Milli-Q), pipetador automático, termômetro e balança analítica modelo Libror AEL – 40SM. A verificação da calibração consistiu em tarar a balança, colocar o balão vazio na balança, anotar o valor da massa, retirá-lo e preenchê-lo até o menisco com água Milli-Q, pesá-lo novamente o balão já preenchido e anotar novamente o valor da massa. Este procedimento foi repetido 10 vezes. De modo similar aos pipetadores, também foram calculados o *DP*, o *DPR* (%) e o *ER* (%) do balão volumétrico, considerando o coeficiente de expansão da água.

6.2 Preparo dos padrões de K, Mg, Mn, Na, e V

Para o estudo de homogeneidade dentro do frasco dos MRCs por INAA, foram utilizados padrões de K, Mg, Mn, Na e V. Para Mg e V, a pipetagem ocorreu de forma direta, isto é, sem a necessidade de diluição prévia da solução padrão. Já para os elementos Mn, Na e V, foram realizadas diluições da solução padrão num balão volumétrico antes de pipetar no papel filtro, uma vez que a concentração desses elementos serem altas na solução padrão, inviabilizando o seu uso de forma direta. Esses padrões foram preparados pipetando-se volumes apropriados das respectivas soluções padrão (Spex), em tiras de papel de filtro Whatman nº 40, usando pipetadores (Eppendorf), com volumes variados, conforme especificado no item de Resultados e Discussão.

Após a secagem, as tiras de papéis de filtro Whatman nº 40 foram cortados, com auxílio de uma tesoura descontaminada previamente, na parte superior descartando-a no lixo e, dobrados, com auxílio de pinças descontaminadas previamente também, na parte inferior e inseridos em invólucros de polietileno de mesma geometria das subamostras.

Os padrões foram armazenados dentro de frascos de polietileno (um para cada elemento), para evitar possíveis contaminações. De forma ilustrativa, as FIG. 3, 4, 5 e 6 mostram aspectos da confecção do padrão de Mg, desde a secagem dos papéis pipetados em capela sob luz ultravioleta e selagem dos padrões até efetivamente os padrões prontos para serem utilizados. Foi utilizada luz ultravioleta para acelerar o processo de secagem, e a capela por ser local

apropriado para evitar contaminação. De forma similar, foram preparados os demais padrões.

FIGURA 3 - Solução Padrão de Mg e Papel filtro Whatman nº 40

FIGURA 4 – Tiras de papel de filtro Whatman nº 40 contendo solução de Mg

FIGURA 5 - Seladora utilizada para o fechamento dos invólucros de padrões de Mg

FIGURA 6 - Padrões de Mg prontos para serem utilizados

6.3 Materiais de referência certificados

6.3.1 Materiais utilizados

As amostras analisadas neste estudo foram o MRC de mexilhão *Perna perna* (Moreira, 2010) o qual foi produzido no Laboratório de Ativação Neutrônica (LAN) do Centro do Reator de Pesquisas (CRPq) do IPEN – CNEN/SP, e o MRC NIST SRM 1566b de tecido de ostra (*Oyster tissue*) preparado no Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST) nos EUA (NIST, 2001).

6.3.2 Preparo das subamostras do MRC de Mexilhão

Para o estudo de homogeneidade dentro do frasco, foi utilizado um único frasco (frasco nº 91) contendo o MR de mexilhão, agitado antes de ser utilizado, e depois foram retiradas subamostras com massas que variaram entre 1 a 250 mg. Neste estudo, foram utilizadas 6 subamostras de cada uma das seguintes massas: 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 50, 100, 150 e 250 mg. Tais massas foram pesadas no mesmo dia, utilizando a balança analítica Shimadzu Libror AEL - 40SM em invólucros de polietileno devidamente limpos e os seus resultados são na base úmida. Nas FIG. 7, 8, 9 e 10 é possível observar de aspectos das etapas do preparo das subamostras do MRC.

FIGURA 7 – Frasco do MRC de tecido de mexilhão

FIGURA 8 – Balança analítica Shimadzu Libror AEL - 40SM

FIGURA 9 – Seladora dos invólucros de padrões e amostras

FIGURA 10 – Imagem das subamostras do MRC de tecido de mexilhão em invólucros de polietileno

6.3.3 Preparo das subamostras do MRC de tecido de ostra

As subamostras do MRC de tecido de ostra foram preparadas de modo similar ao MRC de Mexilhão. De um único frasco foram retiradas subamostras, com massas variadas entre 1 a 100 mg, pesadas em invólucros de polietileno devidamente limpos, utilizando balança analítica Shimadzu Libror AEL - 40SM. Também foram pesadas 6 subamostras para cada uma das massas analisadas. Essas massas foram de 1, 5, 10, 15, 25, 50 e 100 mg. A FIG. 11 apresenta as subamostras deste MRC no invólucros de polietileno.

FIGURA 11 - Imagem das subamostras do MRC de tecido de ostra em invólucros de polietileno

6.3.4 Irradiação e medição das radiações gama induzidas

Neste estudo, para cada irradiação, foram realizadas duas medições, de acordo com a meia vida dos radionuclídeos analisados. Na TAB. 2, são apresentados os radionuclídeos, bem como as respectivas energias de raios gama e meias vidas (CHU e col., 1999). Foi necessário realizar a irradiação e logo após, medir os radionuclídeos em duas etapas, pois os elementos Mg e V possuem meias vidas muito curtas, ou seja, o decaimento desses dois elementos é mais rápido em relação aos demais.

Observar na TAB 2 que a energia dos fotopicos dos elementos Mg (843,74 KeV) e Mn (846,771 KeV) são próximas. Dada esta observação, foram

realizadas as medições dos raios gama de decaimento, em tempos diferentes, evitando assim interferência espectral para a determinação de ambos os elementos. Uma vez que o Mg poderia apresentar interferência espectral para a determinação do Mn, determinou-se o Mn na segunda medição.

TABELA 2 - Radionuclídeos utilizados neste trabalho na determinação por INAA (CHU e col., 1999)

Td	Elemento	Radionuclídeo	Energia, keV	Meia Vida
1ª Medição	Mg	²⁷ Mg	843,74	9,458 min
5 min	V	⁵² V	1434,068	3,743 min
2ª Medição	Mn	⁵⁶ Mn	846,771	2,5785 h
30 min	Na	²⁴ Na	1368,633	14,9490 h
	K	⁴² K	1524,70	12,360 h

Td = Tempo de decaimento para medição

6.4 Ensaios preliminares com as subamostras de mexilhão

6.4.1 Irradiações das subamostras por 20 e 60 segundos

A irradiação ocorreu na estação pneumática nº. 4 do Centro do Reator de Pesquisa Química (CRPq). As subamostras, juntamente com os padrões de interesse, foram inseridas dentro de frasco de polietileno (coelho) e este por sua vez foi enviado para o reator por meio de um sistema pneumático automático, fazendo com que a alíquota e os padrões fossem expostos a fluxo de nêutrons térmicos da ordem de $1,9 \times 10^{12} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, durante 20 s.

Após este período de tempo e de forma automática, o coelho retornou à estação pneumática onde foi monitorada a radioatividade das subamostras e padrões pelo técnico de radioproteção. Imediatamente, após o monitoramento, a subamostra e os padrões foram retirados do coelho e colocados num recipiente de alumínio (panelinha) e foram selados com fita adesiva e identificados. Este último procedimento levou em torno de 3 minutos.

Na FIG. 12 são apresentados aspectos relacionados à determinação dos elementos por irradiação curta no reator IEA-R1.

FIGURA 12 – Sistemática da irradiação simultânea, das subamostras e dos padrões. (a) Verificação do lacre do coelho de polietileno (b) Coelhos de polietileno contendo subamostra do MRC e padrão (c) Coelho inserido no sistema pneumático na Estação nº4 (d) Coelho sendo exposto a fluxo de nêutrons térmicos (e) Retorno do coelho á estação nº4 (f) Subamostras e padrões inseridos em recipiente de alumínio, selado com fita adesiva e identificados (g) Subamostra e os padrões inseridos na prateleira do espectrômetro para análise (h) Medições dos radionuclídeos, utilizando o programa de espectroscopia Canberra Genie 2000 versão 3.2.

De modo similar, foram irradiadas as mesmas subamostras com o tempo de irradiação de 60 segundos. Foi necessária a realização destes dois tempos de irradiação para verificar qual a condição mais apropriada para realização do estudo de homogeneidade dentro do frasco de mexilhão. Neste contexto, estudos preliminares foram feitos com subamostras do mesmo frasco (nº91) de MR de mexilhão, nos diferentes tempos de irradiação e em distâncias diferentes do detector, como mostra a TAB. 3. As medições dos raios gamas formados foram realizadas nas prateleiras 0, 1, 2 e 3 (a diferentes distâncias entre a amostra e o detector).

TABELA 3 - Tempo de irradiação x distância do detector

Material de Referência Certificado de Mexilhão <i>Perna perna</i>			
Subamostras	Tempo de irradiação	Prateleira	Distância do detector, cm
1 a 250 mg	20 segundos	0	0
		1	3,0
		2	6,2
		3	9,6
Subamostras	Tempo de irradiação	Prateleira	Distância do detector, cm
1 a 250 mg	60 segundos	0	0
		1	3,0
		2	6,2
		3	9,6

6.4.2 Determinação por análise por ativação neutrônica instrumental

Para determinar os elementos utilizando a INAA, faz-se necessário aguardar a amostra decair, ou seja, diminuir a atividade radioativa da alíquota a níveis que permitam sua manipulação e medição. Nesse estudo o tempo de decaimento para a realização das medições dos raios gama dos elementos Mg e V foi de aproximadamente 3 minutos após a irradiação. As medições de raios gama para Mg e V foram de 300 s em diferentes distâncias do detector. Já para K, Mn e Na, esperou-se a alíquota decair por período de 1,5 h para se realizar as medições. Para ambos os procedimentos, utilizou-se um detector de Ge de alta pureza da marca Canberra modelo CG2018, acoplado a um analisador espectral

digital da Canberra DAS-1000. Os espectros gama foram coletados e processados utilizando-se o programa de espectroscopia Canberra Genie 2000 versão 3.2 e os cálculos de concentração dos elementos foram efetuados em planilhas do Microsoft Excel.

6.5 Estudo de homogeneidade dentro do frasco para os MRCs de mexilhão e tecido de ostra

6.5.1 Massas e subamostras

Faz parte do estudo de homogeneidade quantificar as concentrações de K, Mg, Mn, Na e V por INAA, presentes nas seis subamostras para cada massa dos MRCs. Neste estudo, por questões econômicas, as quantidades de massas analisadas no MRC de tecido de ostra foram menores em relação ao aplicado para o MRC de mexilhão. As TAB. 4 e 5 esquematizam as subamostras para cada uma dos MR utilizadas. A irradiação das diversas subamostras foi feita de forma completamente aleatória, de modo a se evitar possíveis tendências nos resultados.

TABELA 4 - Massas do MRC de tecido de mexilhão e suas respectivas subamostras

Massas mg	1	5	10	15	20	25	30	50	100	150	250
Subamostras	M1-1	M5-1	M10-1	M15-1	M20-1	M25-1	M30-1	M50-1	M100-1	M150-1	M250-1
	M1-2	M5-2	M10-2	M15-2	M20-2	M25-2	M30-2	M50-2	M100-2	M150-2	M250-2
	M1-3	M5-3	M10-3	M15-3	M20-3	M25-3	M30-3	M50-3	M100-3	M150-3	M250-3
	M1-4	M5-4	M10-4	M15-4	M20-4	M25-4	M30-4	M50-4	M100-4	M150-4	M250-4
	M1-5	M5-5	M10-5	M15-5	M20-5	M25-5	M30-5	M50-5	M100-5	M150-5	M250-5
	M1-6	M5-6	M10-6	M15-6	M20-6	M25-6	M30-6	M50-6	M100-6	M150-6	M250-6

TABELA 5 - Massas do MRC de tecido de ostra e suas respectivas subamostras

Massas mg	1	5	15	25	50	100
Subamostras	O1-1	O5-1	O15-1	O25-1	O50-1	O100-1
	O1-2	O5-2	O15-2	O25-2	O50-2	O100-2
	O1-3	O5-3	O15-3	O25-3	O50-3	O100-3
	O1-4	O5-4	O15-4	O25-4	O50-4	O100-4
	O1-5	O5-5	O15-5	O25-5	O50-5	O100-5
	O1-6	O5-6	O15-6	O25-6	O50-6	O100-6

6.5.2 Determinação das condições para a análise

Antes da realização do estudo de homogeneidade é fundamental otimizar as condições para obtenção dos resultados. A escolha das massas utilizadas para os dois MRCs, o tempo de irradiação e a distância entre o detector e amostra (para medições das atividades induzidas de raios gama de decaimento) foram os fatores utilizados para a otimização das condições.

6.5.3 Irradiações das subamostras

Para este estudo de homogeneidade dentro do frasco, as subamostras foram irradiadas na estação pneumática do nº 4 do CRPq, sob fluxo de nêutrons térmicos na ordem de $1,9 \times 10^{12} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, no reator nuclear de pesquisa IEA-R1, com o tempo de irradiação de 60 s, para os dois MRCs e feitas as medições dos raios gama na Prateleira 3, isto é, a de maior distância entre detector e a amostra (9,6 cm).

6.5.4 Determinação de K, Mg, Mn, Na e V

A determinação das concentrações dos elementos de interesse foi realizada pela medição dos raios gamas num espectrômetro de raios Gama HPGe Canberra acoplado a um analisador multicanal Canberra DAS-1000. Na seguinte sequência: medições dos raios gama na subamostra e nos padrões de Mg e V foram feitas durante 300 s cada, depois nos padrões de Mn, no

multielementar NaK por 1800 s cada e por fim, realizada a medição dos raios gama na mesma subamostra por 3600 s após 1,5 h do término da irradiação.

6.5.5 Obtenção e tratamento dos dados

Os espectros de raios gamas foram coletados identificando os radionuclídeos e, a partir destes dados, foram calculadas as concentrações dos elementos através de uma planilha eletrônica construída anteriormente no programa Microsoft Excel. Para ambos MRCs foram criadas planilhas e calculado as concentrações de K, Mg, Mn, Na e V presente nas subamostras. Posteriormente, foram feitos estudos estatísticos usando os programas Minitab17, Origin 8, Portal Action e GraphPad Prism.

7 RESULTADO E DISCUSSÃO

7.1 Verificação da calibração dos equipamentos laboratoriais

7.1.1 Verificação da calibração dos pipetadores automáticos

A TAB. 6 apresenta o resultado da calibração dos pipetadores automáticos Eppendorf. Os resultados de calibração foram satisfatórios para o estudo, uma vez que os valores obtidos foram comparáveis aos fornecidos pelo fabricante. Vale ressaltar que os valores fornecidos pelo fabricante não são certificados para os valores utilizados no estudo, deste modo, considerou-se os valores próximos ao uso pretendido. No caso do pipetador 10-100 μL , há informação no certificado para os valores 10 μL e 100 μL , para 100-1000 μL apenas 100 μL e 1000 μL e finalmente 1-10 mL somente 1 mL e 10 mL, o que explica alguns valores obtidos serem maiores do que os do fabricante.

TABELA 6 - Calibração dos pipetadores Eppendorf

Pipetador	Volume Nominal (μL)	Volume Calculado (μL)	Desvio Padrão (μL)	Desvio Padrão Relativo (%)	Erro Relativo (%)	Desvio Padrão fabricante (%)	Erro Relativo fabricante (%)
10-100 μL	25	25,35	0,59	2,3	1,40	0,77	0,05
10-100 μL	50	49,95	0,16	0,32	0,10	0,17	0,49
10-100 μL	100	100,25	0,23	0,23	0,25	0,17	0,49
100-1000 μL	500	495,97	0,75	0,15	0,81	0,15	0,48
100-1000 μL	1000	996,7	1,6	0,16	0,33	0,15	0,48
1-10 mL	2500	2476,0	2,3	0,091	0,96	0,42	0,79

7.1.2 Verificação da calibração do balão volumétrico

Na TAB. 7, são apresentados os valores resultantes da verificação da calibração do balão volumétrico. O resultado foi comparado com o valor do certificado de calibração (ALPAX, 2010).

Foi observado que o desvio padrão e o erro relativo são baixos e apropriados para este estudo, ainda que o valor certificado para o balão seja mais alto que o valor calculado.

TABELA 7 - Resultado da verificação da calibração do balão volumétrico de 10 mL

Balão Volumétrico	Volume certificado (mL)	Volume calculado (mL)	DPR (%)	ER (%)
ALR 6830/10	10,002 ± 0,0080	9,9483 ± 0,014	0,14	0,52

7.2 Cálculos das massas dos padrões pipetados

Antes do preparo dos padrões dos elementos de interesse, foram calculados os valores a serem pipetados, determinando a sua massa nos padrões. Tais cálculos podem ser observados na TAB. 8. Os padrões de Mg e K foram pipetados diretamente da solução estoque, por outro lado, para os elementos Mn, Na e V primeiramente foram realizadas diluições e depois pipetados os volumes adequados da solução diluída. A TAB. 8 apresenta os padrões pipetados utilizados neste estudo.

TABELA. 8 - Preparo dos padrões pipetados para INAA a partir de soluções Spex^a

Padrão	Elemento	Concentração na solução original, $\mu\text{g mL}^{-1}$	Volume pipetado 1, mL	Solução diluída, $\mu\text{g mL}^{-1}$	Volume pipetado 2, μL	Massa no padrão, μg
NaK	K	10.018 ± 50	-	-	100,25 ± 0,26	1004,3 ± 5,6
Mg	Mg	9.997 ± 50	-	-	100,25 ± 0,26	1002,2 ± 5,6
Mn	Mn	1.004 ± 2	0,9967 ± 0,0022	100,59 ± 0,41	100,25 ± 0,26	10,084 ± 0,049
NaK	Na	9.994 ± 50	0,9967 ± 0,0022	1001,3 ± 6,2	100,25 ± 0,26	100,38 ± 0,67
V	V	1.001 ± 5	2,476 ± 0,012	249,1 ± 1,9	100,25 ± 0,26	24,98 ± 0,20

^aincertezas são incertezas expandidas, $k = 2$

7.3 Ensaios preliminares com as subamostras de mexilhão *Perna perna*

Os ensaios preliminares tiveram como objetivo verificar as melhores condições para realização do teste de homogeneidade dentro do frasco dos MRCs.

7.3.1 Irradiação por 20 segundos

Os gráficos apresentados nas FIG. 13 a 17 mostram os resultados dos elementos analisados em relação à massa da amostra e em diferentes distâncias

do detector, na comparação com os valores certificados para o MRC apresentados na TAB 9.

TABELA. 9 – Valores certificados para o MRC de mexilhão *Perna perna* (MOREIRA, 2010)

Elemento	Concentração ^a
K	$8,1 \pm 1,1 \text{ g kg}^{-1}$
Mg	$3,60 \pm 0,43 \text{ g kg}^{-1}$
Mn	$23,4 \pm 3,1 \text{ mg kg}^{-1}$
Na	$22,7 \pm 3,6 \text{ g kg}^{-1}$
V	$(2,89 \pm 0,82 \text{ mg kg}^{-1})$

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

FIGURA 13 – Concentração do K obtido em várias massas de amostra do MRC de tecido de mexilhão em diferentes distâncias do detector com irradiação de 20s

FIGURA 14 – Concentração do Mg obtido em várias massas de amostra do MRC de tecido de mexilhão em diferentes distâncias do detector com irradiação de 20s

FIGURA 15 – Concentração do Mn obtido em várias massas de amostra do MRC de tecido de mexilhão em diferentes distâncias do detector com irradiação de 20s

FIGURA 16 – Concentração do Na obtido em várias massas de amostra do MRC de tecido de mexilhão em diferentes distâncias do detector com irradiação de 20s

FIGURA 17 – Concentração do V obtido em várias massas de amostra do MRC de tecido de mexilhão em diferentes distâncias do detector com irradiação de 20s

Considerando a linha contínua como sendo o valor certificado e as linhas pontilhadas suas incertezas nas FIG. 13 a 17 acima, pode-se, de maneira geral, observar que o Mg foi determinado para a maioria das massas em todas as prateleiras, com exceção de 1 e 5 mg. Para a prateleira 0, foram observadas as menores incertezas em comparação com as outras. No caso de V, foi observado que nas prateleiras 3 e 2, a maior parte dos picos de V não foram detectados devido à distância da amostra e o detector. Os valores de Mg e V sobrepuseram a incerteza expandida do material de referência, mas para Mg, massas abaixo de 25 mg apresentaram resultados com maior dispersão.

No caso de K, os melhores resultados foram obtidos na prateleira 0, possivelmente devido à menor sensibilidade da INAA para esse elemento se comparado com os demais. Por outro lado, foi possível determinar Na e Mn em todas as prateleiras, mas nas prateleiras 1 e 0 foi observada tendência a resultados inferiores aos esperados. Esta influência está possivelmente ligada aos tempos mortos elevados, o que também foi observado num estudo anterior (MOREIRA, 2010). Altas dispersões dos resultados foram observadas em massas abaixo de 10 mg para Na.

7.3.2 Irradiação por 60 segundos

Para otimizar os resultados observados no item 7.3.1, foi realizada nova série de experimentos com o tempo de irradiação de 60 s. Os gráficos representados nas FIG. 18 a 22 mostram os resultados dos elementos analisados em relação à massa da amostra e em diferentes distâncias do detector.

FIGURA 18 – Concentração do K obtido em várias massas de amostra do MRC de tecido de mexilhão em diferentes distâncias do detector com irradiação de 60s

FIGURA 19 – Concentração do Mg obtido em várias massas de amostra do MRC de tecido de mexilhão em diferentes distâncias do detector com irradiação de 60s

FIGURA 20 – Concentração do Mn obtido em várias massas de amostra do MRC de tecido de mexilhão em diferentes distâncias do detector com irradiação de 60s

FIGURA 21 – Concentração do Na obtido em várias massas de amostra do MRC de tecido de mexilhão em diferentes distâncias do detector com irradiação de 60s

FIGURA 22 – Concentração do V obtido em várias massas de amostra do MRC de tecido de mexilhão em diferentes distâncias do detector com irradiação de 60s

Ao analisarmos os dados das irradiações nesta condição, pode-se perceber que a maioria dos elementos presentes nas diversas massas irradiadas foram detectados em todas as prateleiras, particularmente os elementos de meia vida mais curta, como Mg e V.

Na determinação dos elementos K, Mn e Na observou-se maior número de picos encontrados nas diversas subamostras em relação ao experimento feito nas condições de irradiação a 20 s, principalmente na prateleira 3 (maior distância do detector), obtendo-se assim, menor dispersão dos resultados. Isso se relaciona à maior atividade da amostra quando analisada (amostra mais ativa). Além disso, não se verificou maior interferência relacionada ao tempo morto ao se comparar as condições de irradiação de 20 e 60 s.

Foi observado que na condição de 20 s não houve diferença nos resultados entre a distância do detector em analisar as subamostras. Entretanto, para a maioria dos elementos alguns picos não foram detectados ou foram encontrados valores discrepantes do esperando, o que pode ser devido à geometria da amostra e o tempo morto. Por outro lado, no tempo de irradiação 60 s, obtiveram-se melhores resultados em relação a 20 s de irradiação. Isso ocorreu porque a amostra foi mais ativada e não houve problemas com o maior tempo morto observado.

Diante disso, analisando as duas condições, 60 s de tempo de irradiação foi escolhido para realização do estudo de homogeneidade dentro do frasco, por ser a condição mais apropriada para a determinação dos elementos com as massas menores e com maior distância do detector (prateleira 3), o que pode minimizar problemas de tempo morto e diferenças de geometria das subamostras.

7.4 Limite de Detecção (L_D) e Limite de Quantificação (L_Q)

Na TAB. 10 são apresentado os L_D e L_Q para os elementos analisados neste estudo. Os limites foram obtidos para a matriz de mexilhão, para as condições de análise utilizadas neste trabalho, isto é, irradiação de amostras por 60 s e medição das radiações gama induzidas na Prateleira 3. A estimativa do L_D e do L_Q foram importantes para se verificar a sensibilidade da técnica quando à detecção e à quantificação dos analitos ao se alterar a massa da subamostra.

TABELA. 10 - Limites de detecção, L_D e quantificação, L_Q para K, Mg, Mn, Na e V obtidos para INAA

Elemento	K		Mg		Mn		Na		V	
	g kg ⁻¹		g kg ⁻¹		mg kg ⁻¹		g kg ⁻¹		mg kg ⁻¹	
Massa, mg	L_D	L_Q	L_D	L_Q	L_D	L_Q	L_D	L_Q	L_D	L_Q
1	0,20	0,609	0,262	0,80	0,088	0,267	0,0081	0,024	3,2	9,6
5	0,095	0,288	0,14	0,43	0,031	0,094	0,0026	0,0079	1,1	3,5
10	0,057	0,17	0,081	0,25	0,024	0,074	0,0015	0,0046	0,86	2,6
15	0,045	0,14	0,078	0,24	0,029	0,087	0,0014	0,0043	0,69	2,1
20	0,040	0,12	0,070	0,21	0,014	0,042	0,0012	0,0035	0,54	1,6
25	0,032	0,10	0,056	0,17	0,013	0,039	0,0011	0,0033	0,51	1,6
30	0,047	0,14	0,065	0,20	0,008	0,023	0,0010	0,0030	0,70	2,1
50	0,043	0,13	0,046	0,14	0,005	0,017	0,0008	0,0025	0,45	1,4
100	0,019	0,058	0,036	0,11	0,006	0,018	0,0005	0,0016	0,31	0,9
150	0,015	0,046	0,028	0,085	0,005	0,015	0,0004	0,0013	0,23	0,7
250	0,011	0,034	0,027	0,083	0,004	0,014	0,0003	0,0010	0,34	1,0

Os valores obtidos de L_D e L_Q estão todos bem abaixo dos valores certificados para o material de referência de mexilhão (MOREIRA, 2010). Portanto, é possível detectar e quantificar todos os elementos analisados neste estudo por INAA em matrizes biológicas, mesmo para massas muito pequenas. É possível quantificar Mn e Na mesmo para subamostras de 1 mg. Por outro lado, só foi possível detectar K, Mg e V em massas acima de 10 mg. Além disso, como o tecido de ostra é também uma matriz biológica de composição semelhante, optou-se por considerar os mesmos valores de L_D e L_Q obtidos para o material de mexilhão, adequados ao estudo deste material.

Os resultados da TAB. 10 estão apresentados de maneira gráfica nas FIG. 23 a 26. Foi observado que tanto L_D quanto L_Q apresentaram pequeno aumento ao se diminuir a massa da amostra analisada, o que é esperado.

FIGURA 23 - Limites de Detecção, L_D para os elementos K, Mg e Na

FIGURA 24 - Limites de Quantificação, L_Q para os elementos K, Mg e Na

FIGURA 25 - Limites de Detecção, L_D para os elementos Mn e V

FIGURA 26 - Limites de Quantificação, L_Q para os elementos Mn e V

7.5 Estudo de Homogeneidade dentro do frasco para o MRC de tecido de mexilhão

O frasco nº91 foi utilizado para o estudo de homogeneidade dentro do frasco para K, Mg, Mn, Na e V por INAA. As massas utilizadas foram 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 50, 100, 150 e 250 mg, cada uma com seis subamostras. Os resultados apresentados estão na base úmida.

Antes da realização do estudo de homogeneidade dentro do frasco, foi realizada a verificação da existência de valores extremos no conjunto dos resultados do MR de mexilhão, aplicando-se o teste de Grubbs, a 95 % de confiança (FARRANT, 1997). Foi utilizado o software Minitab17 para este fim. Não foram observados valores extremos para nenhum dos elementos avaliados.

As concentrações dos elementos determinados nas diversas massas podem ser observadas na TAB. 11, onde estão representadas as médias juntamente com os seus respectivos intervalos de confiança para as seis subamostras analisadas, podendo ser comparados com os valores certificados apresentados na TAB. 9, na página 49 desta dissertação.

O intervalo de confiança (IC) é uma maneira de cálculo para a estimativa de um parâmetro desconhecido. A ideia é construir um intervalo de confiança para o parâmetro com uma probabilidade de $1 - \alpha$ (nível de confiança) de que o intervalo contenha o parâmetro verdadeiro. Trata-se de um procedimento de inferência estatística aplicada ao estudo de várias amostras, análise de correlação e regressão, entre outros (OLIVO, 2008).

Um IC com um nível de confiança de 95% tem chance de 95%, de abarcar a média da população. Isto significa que, se a experiência for repetida muitas vezes, 95% ICs conteriam a verdadeira média da população (CUMMING e FINCH, 2005). CLARCK (2004) considera que uma das vantagens da utilização dos intervalos de confiança é o fato dele revelar ao investigador a amplitude dos resultados para a amostra observada.

TABELA 11 - Concentração de elementos obtida por INAA para massas diferentes de amostra, para o estudo de homogeneidade dentro do frasco (base úmida)^a

Elemento	K	Mg	Mn	Na	V
Massa, mg	g kg ⁻¹	g kg ⁻¹	mg kg ⁻¹	g kg ⁻¹	mg kg ⁻¹
1	ND	ND	19,6 ± 4,3	23,1 ± 3,1	ND
5	ND	4,7 ± 4,8	20,9 ± 1,9	22,2 ± 1,1	ND
10	8,8 ± 1,8	3,8 ± 0,5	21,8 ± 2,2	20,8 ± 1,2	ND
15	6,4 ± 1,4	3,6 ± 0,2	24,6 ± 5,1	21,6 ± 1,1	3,6 ± 0,7
20	11,5 ± 3,2	4,1 ± 0,2	22,6 ± 3,2	21,5 ± 1,3	3,7 ± 0,7
25	9,9 ± 1,9	4,1 ± 0,6	21,4 ± 1,8	21,9 ± 1,2	3,7 ± 0,6
30	8,6 ± 1,9	3,9 ± 0,4	21,2 ± 1,6	20,8 ± 1,7	3,9 ± 0,5
50	8,4 ± 1,4	3,9 ± 0,3	21,3 ± 2,1	20,6 ± 1,0	2,9 ± 0,6
100	8,9 ± 0,7	3,9 ± 0,4	22,1 ± 1,1	21,2 ± 1,2	3,0 ± 0,5
150	8,3 ± 0,5	3,9 ± 0,3	21,9 ± 2,6	21,0 ± 1,1	3,2 ± 0,7
250	7,7 ± 0,9	3,6 ± 0,4	21,2 ± 2,1	20,6 ± 1,3	3,2 ± 0,3

^amédia ± intervalo de confiança a 95 %

De maneira ilustrativa, as FIG. 27 a 31 representam os resultados de média de seis determinações e os respectivos IC, em comparação com os valores certificados para os elementos, obtidos para as diversas massas utilizadas neste estudo. Os gráficos dessas figuras foram preparados com auxílio do programa GraphPad Prism.

Para análise dos gráficos nas figuras, os seguintes parâmetros foram utilizados:

- Linha superior é o limite superior da concentração do certificado, levando em conta a incerteza do valor certificado;
- Linha inferior é o limite inferior da concentração do certificado, levando-se em conta a incerteza do valor certificado;
- Linha colorida entre o máximo e o mínimo é o valor certificado do MRC.

FIGURA 27 - Concentração de K em função das massas de mexilhão

FIGURA 28 - Concentração de Mg em função das massas de mexilhão

FIGURA 29 - Concentração de Mn em função das massas de mexilhão

FIGURA 30 - Concentração de Na em função das massas de mexilhão

FIGURA 31 - Concentração de V em função das massas de mexilhão

Ao se analisar cada elemento, pôde-se perceber que o pico do K foi detectado para a maioria das massas, com exceção das massas de 1 mg e 5 mg. Isso possivelmente está relacionado à quantidade pequena da amostra analisada, embora tenha sido irradiada por 60 s. Além disso, para massas menores que 30 mg, foi notada maior variabilidade do intervalo de confiança em relação às demais subamostras.

No caso do Mg, foi observado que para as massas 10 mg, 25 mg e 250 mg a dispersão foi maior em relação às demais massas.

As concentrações de Mn e Na apresentaram excelentes resultados em comparação com os demais elementos, ainda que em geral a média dos resultados tende ficar um pouco abaixo dos valores certificados. Possivelmente

isso se deve ao fato de não ter sido realizada correção para massa seca. Os picos desses elementos foram detectados em todas as massas com intervalo de confiança menor. Para ambos os elementos, embora tenha sido possível a detecção, foi observada maior dispersão dos resultados para a massa de 1 mg.

Não foi possível quantificar o V para massas menores de 15 mg, relacionado provavelmente à meia vida relativamente curta do elemento. Também foi observado maior intervalo de confiança para as massas menores em comparação às maiores.

Dando continuidade ao estudo de homogeneidade dentro do frasco, foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk para normalidade, a 95 % de confiança, calculado com o programa Origin 8.0 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, 2008). Observou-se que para todos os conjuntos de dados, o valor de p foi maior que α . Assim, concluiu-se que os dados foram retirados de população normalmente distribuída.

Após o teste de normalidade, é importante verificar se há existência de tendências nos resultados (ABNT, 2012). Inicialmente foi verificado se há alguma tendência em relação à ordem de medição e posteriormente em função da massa da amostra. Nas FIG. 32 a 36 estão apresentados os resultados obtidos para o MRC de mexilhão ordenados por ordem de medição e massa.

Embora tenham sido analisadas as massas mencionadas no item 7.3, os elementos K, Mg e V não foram detectados em todas as massas das subamostras. Por este motivo, resultados para K são apresentados a partir de 10 mg e de Mg e V a partir de 15 mg. Além disso, os resultados ordenados por ordem de massa são apresentados em dois gráficos, variando até 250 mg (b) e até 50 mg (c), de forma a facilitar a visualização dos resultados.

Por inspeção visual das FIG. 32 a 36, foi possível verificar que os coeficientes lineares correspondem, grosso modo, à média de todos os resultados utilizados na construção das curvas. Além disso, os coeficientes de regressão linear tendem a zero, tanto nas figuras (a) quanto nas (b) e (c), indicando, juntamente com os coeficientes de determinação, R^2 , próximos de zero, que não há correlação, e, portanto, tendência entre as variáveis.

FIGURA 32 - Tendência dos resultados no estudo de homogeneidade dentro do frasco de K para o MRC de mexilhão: a) Resultados apresentados por ordem de medição; b) e c) resultados apresentados por ordem de massas.

FIGURA 33 - Tendência dos resultados no estudo de homogeneidade dentro do frasco de Mg para o MRC de mexilhão: a) Resultados apresentados por ordem de medição; b) e c) resultados apresentados por ordem de massa

FIGURA 34 - Tendência dos resultados no estudo de homogeneidade dentro do frasco de Mn para o MRC de mexilhão: a) Resultados apresentados por ordem de medição; b) e c) resultados apresentados por ordem de massa

FIGURA 35 - Tendência dos resultados no estudo de homogeneidade dentro do frasco de Na para o MRC de mexilhão: a) Resultados apresentados por ordem de medição; b) e c) resultados apresentados por ordem de massa

FIGURA 36 - Tendência dos resultados no estudo de homogeneidade dentro do frasco de V para o MRC de mexilhão: a) Resultados apresentados por ordem de medição; b) e c) resultados apresentados por ordem de massa

Para a confirmação estatística deste resultado, ajustou-se o modelo linear aos dados e foi realizado teste de significância para os coeficientes de regressão linear. A partir das estatísticas de regressão, obtidas por análise de variância (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), b é o coeficiente linear (intercepto) da curva de regressão linear e $\bar{x}$ é a média dos resultados.

Os resultados do teste de ANOVA para regressão linear são apresentados na TAB. 12.

TABELA 12 - Dados da ANOVA para regressão linear para o estudo de homogeneidade no material de referência de mexilhão para o nível de significância α de 0,05

Elemento	Ordem	Fonte de variação	Média Quadrática	<i>F</i>	Valor de <i>p</i>	<i>F</i> _C	<i>v</i> ₁	<i>v</i> ₂
K	Medição	Entre	2,92	0,726	0,398	4,027	1	52
		Dentro	4,02					
	Massa	Entre	7,91	2,018	0,161			
		Dentro	3,92					
Mg	Medição	Entre	0,17	1,297	0,260	4,027	1	52
		Dentro	0,13					
	Massa	Entre	0,27	2,042	0,159			
		Dentro	0,13					
Mn	Medição	Entre	0,04	0,006	0,937	3,991	1	64
		Dentro	5,55					
	Massa	Entre	0,15	0,026	0,872			
		Dentro	5,55					
Na	Medição	Entre	4,56	2,191	0,144	3,991	1	64
		Dentro	2,08					
	Massa	Entre	8,94	4,436	0,039			
		Dentro	2,01					
V	Medição	Entre	0,03	0,064	0,801	4,052	1	46
		Dentro	0,41					
	Massa	Entre	1,84	5,001	0,030			
		Dentro	0,37					

Ao se verificar a regressão linear por ordem de medição, F calculado foi menor que F crítico para todos os elementos e o valor de p , menor que 0,05 e, portanto, o modelo linear não foi significativo a 95 % para o caso da existência de tendência durante a aquisição dos resultados. O mesmo resultado foi observado para ordem de massa, exceto para Na e V. Para esses dois elementos, F calculado foi maior que F crítico, indicando alguma tendência nos resultados. Contudo, ao se repetir o teste com a eliminação da massa de 1 mg para o caso do Na, o teste mostrou que não houve tendência nos resultados (F calculado = 3,161 < F crítico = 4,007). Tal comportamento não foi observado para o V.

A seguir, foi utilizada a Análise de Variância por fator único (ANOVA) para se verificar se há igualdade entre as concentrações dos elementos obtidos nas diversas massas, conforme apresentado na TAB. 13.

TABELA 13 - Análise de Variância para o teste de homogeneidade dentro do frasco para o material de referência de mexilhão para nível de significância α de 0,05

Elemento	Fonte de variação	Média quadrática	F	Valor de p	F crítico	v_1	v_2
K	Entre	12	4,524	0,00044	2,152	8	45
	Dentro	2,6					
Mg	Entre	0,23	1,980	0,080	2,250	7	40
	Dentro	0,11					
Mn	Entre	5,1	0,924	0,519	2,008	10	55
	Dentro	5,5					
Na	Entre	3,5	1,907	0,064	2,008	10	55
	Dentro	1,9					
V	Entre	0,84	2,590	0,030	2,250	7	40
	Dentro	0,32					

Analisando os resultados após aplicação da ANOVA, percebeu-se que para o elemento Mg, Mn e Na há igualdade entre as concentrações pela análise estatística proposta, uma vez que F calculado foi menor que F crítico. Por outro lado, para o K e V não foi observada a igualdade entre as médias, possivelmente devido aos valores das médias encontradas nas massas de 30 e 50 mg para V, e

10, 15 e 20 mg para K. Isso implica que pelo menos para os elementos Mg, Mn e Na, o resultado de concentração independe da massa da amostra utilizada.

De maneira complementar, além destes testes, foi aplicado o teste de Tukey para avaliar se há diferença significativa entre as diversas massas, de forma a complementar os resultados do teste de ANOVA para as médias.

O Teste proposto por Tukey é um teste em que, para uma família de todas as $c = \frac{1}{2}k(k-1)$ comparações duas a duas, a taxa de erro da família dos testes é exatamente α e o intervalo de confiança é exatamente $(1 - \alpha)$, isto é, o teste compara a média de cada tratamento com as médias dos demais tratamentos, sempre duas a duas, identificando se há diferença entre elas (PORTAL ACTION, 2016). O resultado do teste de Tukey foi analisado para os conjuntos de dados, considerando que a) pertence ao mesmo grupo, isto é, não há diferença entre as médias das concentrações do mensurando numa mesma população; b) e c) pertencem a grupos diferentes, ou seja, há diferença entre as médias numa mesma população.

Com exceção de K, todos os intervalos de média das massas dois a dois, pertencem ao mesmo grupo ou população. No caso do K, percebeu-se que a quantidade da massa influencia diretamente na determinação da concentração do mensurando na amostra. Portanto, para K, para massas menores que 20 mg foi observada exatidão menor em seus resultados. Entretanto, ao se excluir os valores de 10, 15 e 20 mg, também foi observado que os resultados pertencem ao mesmo grupo. Na FIG. 37 são apresentados os resultados obtidos para o K e na FIG. 38 são apresentados os resultados da aplicação do teste de Tukey para os demais elementos.

No caso do V, ainda que o teste de ANOVA tenha indicado a não igualdade das médias, não foi verificada diferença significativa a partir do teste de Tukey. Tal discrepância pode estar relacionada à proximidade dos valores entre o F calculado e o F crítico obtido no teste de ANOVA (F calculado = 2,590 e F crítico = 2,250).

FIGURA 37 - Comparação das médias das concentrações obtidas para o K no MRC de Mexilhão. (a) Não há diferença; (b) e (c) Há diferença

FIGURA 38 - Resultado do Teste de Tukey. Comparação das médias das concentrações obtidas para o Mg, Mn, Na e V no MRC de Mexilhão. (a): significa que todos pertencem ao mesmo grupo e, portanto, não há diferença

7.5.1 Determinação da massa mínima de amostra

Uma vez que o desvio padrão de repetibilidade 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 (ABNT, 2012).

Para se estimar a massa mínima de amostra necessária para análise do 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 repetibilidade de métodos analíticos (ISO, 2005). Utilizaram-se três subamostras de 150 mg, cuja determinação de elementos por INAA foi realizada em condições de repetibilidade, com dez repetições da medição das radiações gama induzidas em um mesmo espectrômetro. No entanto, para os elementos Mg e V, foi necessário irradiar a alíquota mais de uma vez devido ao rápido decaimento dos radionuclídeos para se obter estimativa da massa mínima.

Na FIG. 39 é apresentada em forma gráfica a comparação dos resultados obtidos para os elementos analisados neste estudo.

Para Mg, os resultados de DPR obtidos para 15 e 20 mg foram excluídos dos gráficos pois, por problemas experimentais, foram obtidos resultados anômalos para estas massas. Observou-se que as curvas de DPR cruzam as retas de s_r para os elementos K, Mg, Na e V, definindo experimentalmente os respectivos valores de massa mínima. Para Mn, o DPR foi maior que s_r para quase todas as massas utilizadas no estudo e, portanto, optou-se por utilizar a massa mínima de 25 mg, na qual o DPR começa a apresentar maior flutuação ao se diminuir a massa de amostra.

FIGURA 39 - Desvio padrão relativo em função da massa para o estudo de homogeneidade dentro do frasco para o MR de mexilhão. Estimativa do desvio padrão de repetibilidade do método (.....)

Na TAB. 14 são apresentadas as estimativas de massa mínima para os elementos determinados por INAA no estudo de homogeneidade dentro do frasco do material de referência de mexilhão. Optou-se por utilizar valores de massa medidos experimentalmente para a definição de massas mínimas.

TABELA 14 - Estimativa de massa mínima do MR de mexilhão, obtida por INAA

Elemento	Massa mínima, g
K	0,100
Mg	0,075
Mn	0,025
Na	0,015
V	0,100

Resultados de massa mínima usuais foram obtidos para K e V, isto é, 100 mg de amostra. Já para os demais elementos, foi possível demonstrar que amostras com massas menores podem ser utilizadas, sem perda de confiança nos respectivos valores certificados. O caso do Mn em particular é muito interessante, e também reflete a ótima capacidade analítica da técnica de INAA para a determinação deste elemento. Estes resultados confirmam a expectativa de MOREIRA (2010) sobre a provável diminuição dos valores de massa mínima ao se utilizar outros planejamentos para o estudo, com massas inferiores ao se aplicar o método de INAA.

7.6 Estudo de Homogeneidade dentro do frasco para o MRC de tecido de ostra

De modo similar ao estudo de homogeneidade dentro do frasco do MRC de mexilhão, foi analisado o MRC de tecido de ostra nas mesmas condições de irradiação, tempo de contagem, equipamento, analista, detector e distância do detector, diferindo apenas nas quantidades de massas utilizadas, que neste caso foram 1, 5, 15, 25, 50 e 100 mg. Esta análise foi importante para verificar se a técnica INAA pode ser proposta ao estudo de homogeneidade dentro do frasco também para o MRC de tecido de ostra, uma espécie diferente do mexilhão, mas

no entanto, de matriz semelhante e produzida com granulometria menor que o material de mexilhão.

Para a análise dos resultados, os mesmos fundamentos aplicados anteriormente foram utilizados. Foi aplicado o teste de Teste de Grubbs, onde não foram encontrados valores extremos e realizou-se o teste de Shapiro-Wilk para normalidade a 95% de confiança, no qual se observou que, para todas as massas analisadas, os conjuntos de resultados foram considerados normais para K, Mg, Mn, Na e V.

As concentrações dos elementos analisados podem ser observadas na TAB. 15, onde estão representadas as médias para seis subamostras, juntamente com os seus respectivos intervalos de confiança. Uma vez que as concentrações dos elementos neste MR são bem mais baixas do que as observadas no MRC de mexilhão, não foi possível a detecção de K e Mg para massas inferiores a 25 mg e para V, inferiores a 50 mg. Na TAB. 16 são apresentados os valores certificados para o MRC, para comparação.

TABELA 15 - Concentrações de elementos obtidas por INAA para massas diferentes de amostra de tecido de ostra, para o estudo de homogeneidade dentro do frasco (base úmida)^a.

Elemento	K	Mg	Mn	Na	V
Massa, mg	g kg ⁻¹	g kg ⁻¹	mg kg ⁻¹	g kg ⁻¹	mg kg ⁻¹
1	ND	ND	17,9 ± 2,6	3,34 ± 0,22	ND
5	ND	ND	18,1 ± 1,7	3,12 ± 0,25	ND
15	5,8 ± 1,3	ND	18,2 ± 0,8	3,01 ± 0,29	ND
25	5,96 ± 0,56	1,11 ± 0,13	18,0 ± 0,9	2,97 ± 0,21	ND
50	5,76 ± 0,46	1,12 ± 0,15	16,1 ± 0,6	2,85 ± 0,12	0,721 ± 0,080
100	6,16 ± 0,40	1,11 ± 0,12	17,4 ± 1,5	2,92 ± 0,25	0,592 ± 0,086

^aMédia e Intervalo de confiança para 6 determinações

TABELA. 16 – Valores certificados para o MRC de tecido de ostra, NIST SRM 1566b (NIST, 200)

Elemento	Concentração ^a
K	$6,52 \pm 0,09 \text{ g kg}^{-1}$
Mg	$1,085 \pm 0,023 \text{ g kg}^{-1}$
Mn	$18,5 \pm 0,2 \text{ mg kg}^{-1}$
Na	$3,297 \pm 0,053 \text{ g kg}^{-1}$
V	$0,577 \pm 0,023 \text{ mg kg}^{-1}$

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

Os resultados da determinação dos elementos de interesses para o MRC de tecido de ostra estão ilustrados graficamente nas FIG. 40 a 44. Para análise dos gráficos, foram considerados os mesmos parâmetros utilizados na análise do MRC de mexilhão, isto é:

- Linha superior é o limite superior da concentração do certificado, levando em conta a incerteza do valor certificado;
- Linha inferior é o limite inferior da concentração do certificado, levando-se em conta a incerteza do valor certificado;
- Linha colorida entre o máximo e o mínimo é o valor certificado do MRC.

FIGURA 40 - Concentração do K em função das massas de Oyster, 5 a 100 mg

FIGURA 41 - Concentração do Mg em função das massas de Oyster, 25 a 100mg

FIGURA 42 - Concentração do Mn em função das massas de Oyster, 1 a 100 mg

FIGURA 43 - Concentração do Na em função das massas de Oyster, 1 a 100 mg

FIGURA 44 - Concentração do V em função das massas de Oyster, 50 á 100 mg

Foi observado que, em relação ao K, há a possibilidade de se trabalhar com massas abaixo de 100 mg, sendo possível a quantificação a partir de 25 mg de amostra. No estudo de homogeneidade dentro do frasco, notou-se que o IC é maior do que esperado para este elemento, comparando com os valores do certificado. Além disso, as concentrações do K observadas foram menores do que as esperadas, ao se levar em conta o certificado do material de referência.

No caso do Mg, obteve-se também intervalos de confiança altos quando comparado com o valor do certificado, ainda que os resultados sejam coerentes com o valor certificado.

Para Mn notou-se que é possível quantificar este elemento em massas bem menores do que as utilizadas usualmente, em torno de 100 mg. Para todas as massas proposta nesta matriz, foi possível quantificar o elemento.

Já para o Na, embora toda a análise tenha sido realizada tomando os devidos cuidados desde a pesagem das subamostra, passando por toda a etapa instrumental da técnica, os resultados do Na não foram satisfatórios, se comparados ao valor certificado, ficando de maneira geral, abaixo dos valores certificados para este elemento.

A concentração do V no tecido de ostra é bem inferior ao encontrado no MR de mexilhão e só foi possível quantificar o elemento a partir de 50 mg.

Assim como foi realizada a análises de tendência dos resultados para o MRC de mexilhão, foi proposta para o MRC de tecido de ostra, esta mesma

análise estatística, isto é, análise de tendência dos resultados em função da ordem de medição e em função da massa.

Pôde-se perceber que para o K, o fotopico do elemento foi detectado nas massas 15, 25, 50 e 100 mg, não sendo detectado nas massas de 1 e 5 mg, conforme mostra a FIG. 45. Supõe-se que este fato esteja relacionado à dificuldade em detectar o K em amostras muito pequenas para este tipo de matriz nas condições utilizadas para a INAA, uma vez que a concentração deste elemento é baixa em tecido de ostra.

FIGURA 45 - Tendência dos resultados no estudo de homogeneidade dentro do frasco de K para o MRC de tecido de ostra: a) Resultados apresentados por ordem de medição; b) resultados apresentados por ordem de massa

A FIG. 46 ilustra graficamente os resultados para Mg. Este elemento não foi detectado nas massas 1, 5 e 15 mg. Como os demais elementos, ele também está em menor concentração em tecido de ostra quando comparado com MR de mexilhão. Além disso, o fato de não ter sido detectado nessas massas pode também estão relacionado à meia vida deste elemento, ou seja, este elemento decai rapidamente. Assim, tem-se três fatores a dificultar a análise: a quantidade pequena de amostra, o decaimento rápido do elemento e a distância amostra-detetor (Prateleira 3). Já para as massas de 25, 50 e 100 mg foi possível quantificar o Mg.

FIGURA 46 - Tendência dos resultados no estudo de homogeneidade dentro do frasco de Mg para o MRC de tecido de ostra: a) Resultados apresentados por ordem de medição; b) resultados apresentados por ordem de massa

Para Mn e Na, FIG. 47 e 48 respectivamente, os fotopicos foram detectados em todas as massas propostas. Ambos os elementos têm meia vida não tão curta, ou seja, uma vez amostra irradiada, as concentrações dos radionuclídeos formados não decaem tão rapidamente como é o caso do Mg e V (TAB. 2), facilitando, assim, a detecção por INAA. As concentrações obtidas destes elementos, comparando com as suas concentrações das demais alíquotas foram próximas uma das outras, evidenciando a exatidão do método utilizado.

FIGURA 47 - Tendência dos resultados no estudo de homogeneidade dentro do frasco de Mn para o MRC de tecido de ostra: a) Resultados apresentados por ordem de medição; b) resultados apresentados por ordem de massa

FIGURA 48 - Tendência dos resultados no estudo de homogeneidade dentro do frasco de Na para o MRC de tecido de ostra: a) Resultados apresentados por ordem de medição; b) resultados apresentados por ordem de massa

Finalmente, na FIG. 49 está representado o resultado das concentrações do elemento V. Este elemento tem meia vida muito curta, em torno de 3 s, o que torna um desafio detectá-lo em amostras nas quais há baixa concentração do mesmo. Para as massas 1, 5, 15 e 25 mg não foi possível detectá-lo, sendo possível apenas nas massas 50 e 100 mg.

FIGURA 49 - Tendência dos resultados no estudo de homogeneidade dentro do frasco de V para o MRC de tecido de ostra: a) Resultados apresentados por ordem de medição; b) resultados apresentados por ordem de massa

Após a irradiação da amostra por 60 s, ela retorna à estação pneumática, onde é retirada do coelho (tubo de polietileno) e colocada na “panelinha” e “selada” com fita crepe e, por fim, colocada no “castelo” de chumbo para, então, ser levada ao laboratório ao lado para ser medida. Todos estes procedimentos levam em torno de 3 min para serem completados. Diante disso, não foi possível detectar V nas amostras de massa menor devido o decaimento do radionuclídeo ser muito rápido e a pequena massa da amostra ter baixa concentração.

De maneira geral, não foi possível a observação de tendências em massa ou ordem de medição a partir dos resultados dos gráficos de tendência para o MRC de tecido de ostra.

De acordo com os resultados do teste de ANOVA para regressão linear, apresentados na TAB. 17, com exceção do Na e V por ordem de massa, F calculado foi menor que F crítico para todos os elementos e o valor de p , menor que 0,05 e, portanto, o modelo linear não foi significativo a 95 % de confiança para o caso da existência de tendência durante a aquisição dos resultados. No caso do Na, ao se excluir a massa de 1 mg do teste, F calculado também foi menor que F crítico.

TABELA 17 - ANOVA para regressão linear ao estudo de homogeneidade no material de referência tecido de ostra para nível de significância α de 0,05

Elemento	Ordem	Fonte de variação	Média quadrática	F	Valor de p	F_C	v_1	v_2
K	Medição	Entre	0,0216	0,042	0,839	4,301	1	22
		Dentro	0,509					
	Massa	Entre	0,283	0,569	0,459			
		Dentro	0,497					
Mg	Medição	Entre	0,0204	1,515	0,236	4,494	1	16
		Dentro	0,0135					
	Massa	Entre	3,2E-05	0,002	0,963			
		Dentro	1,5E-02					
Mn	Medição	Entre	0,779	0,328	0,571	4,130	1	34
		Dentro	2,37					
	Massa	Entre	5,1E+00	2,244	0,143			
		Dentro	2,3E+00					
Na	Medição	Entre	0,120	1,799	0,189	4,130	1	34
		Dentro	0,0667					
	Massa	Entre	4,3E-01	7,523	0,009			
		Dentro	5,7E-02					
V	Medição	Entre	0,000171	0,014	0,907	4,965	1	10
		Dentro	0,0118					
	Massa	Entre	5,0E-02	7,237	0,023			
		Dentro	6,9E-03					

A seguir, foi utilizada a Análise de Variância por fator único (ANOVA) para se verificar se há igualdade entre as concentrações dos elementos obtidos nas diversas massas, conforme apresentado na TAB. 18.

TABELA 18 - Análise de Variância para o teste de homogeneidade dentro do frasco para o MRC de tecido de ostra para nível de significância α de 0,05

Elemento	Fonte de variação	Média quadrática	F	Valor de p	F_c	v_1	v_2
K	Entre	0,19	0,349	0,790	3,098	3	20
	Dentro	0,53					
Mg	Entre	0,00	0,028	0,973	3,682	2	15
	Dentro	0,02					
Mn	Entre	3,86	1,836	0,136	2,534	5	30
	Dentro	2,11					
Na	Entre	0,19	3,942	0,007	2,534	5	30
	Dentro	0,05					
V	Entre	0,05	7,237	0,023	4,965	1	10
	Dentro	0,01					

Analisando os resultados após aplicação da ANOVA, percebeu-se que para os elementos Mg, Mn e K há igualdade entre as concentrações pela análise estatística proposta, uma vez que F calculado foi menor que F crítico. Por outro lado, para o Na e V não foi observada a igualdade entre as médias. Isso implica que pelo menos para o elemento Mg, Mn e K, o resultado de concentração independe da massa da amostra. Ao se retirar do conjunto de dados os resultados para subamostras de 1 mg para o Na, foi possível verificar a igualdade de massas.

Dando continuidade ao estudo de homogeneidade dentro do frasco para MRC de tecido de ostra, foi aplicado o teste de Tukey para avaliar se há diferença significativa entre as diversas massas, de forma a complementar os resultados do teste de ANOVA para as médias. A FIG. 50 apresenta os resultados do Teste de Tukey para K, Mg, Mn e V enquanto a FIG. 51 apresenta os resultados para Na.

FIGURA 50 - Resultado do Teste de Tukey. Comparação das médias das concentrações obtidas para o K, Mg, Mn, e V no MRC de tecido de ostra (a): significa que todos pertencem ao mesmo grupo e, portanto, não há diferença

FIGURA 51 - Comparação das médias das concentrações obtidas para o Na no MRC de Mexilhão. (a) não há diferença; (b) há diferença

Foi observado que, com exceção do Na e V, os demais elementos foram aprovados no teste de Tukey, isto é, a hipótese nula de igualdade entre as médias de concentração não foi descartada, pois as médias para K, Mg e Mn pertencem ao mesmo grupo. Para Na, ao se excluir a média da concentração da massa de 1 mg e aplicado o teste novamente, notou-se que neste caso o Na pertencem à mesma população.

7.6.1 Determinação da massa mínima de amostra

Os desvios padrão relativos percentuais DPR (%) em função da massa, obtidos para o MRC de tecido de ostra estão ilustrados em forma gráfica na FIG. 52.

FIGURA 52 - Desvio padrão relativo em função da massa para o estudo de homogeneidade dentro do frasco para o MR de tecido de ostra. Estimativa do desvio padrão de repetibilidade do método (.....)

Observou-se que as curvas de DPR (%) cruzam as retas de s_r apenas para os elementos K e Mn, definindo experimentalmente os respectivos valores de massa mínima. Para Mg e Na, o DPR (%) foi maior que s_r para quase todas as massas utilizadas no estudo e, portanto, optou-se por utilizar a massa mínima de 25 mg, na qual o DPR (%) começa a apresentar maior flutuação ao se diminuir a massa de amostra. Para o V, devido às dificuldades experimentais para se determinar o elemento, o gráfico de DPR (%) versus massa apresentou comportamento anômalo e com resultados de DPR (%) inferiores ao s_r . Optou-se por definir a massa mínima no intervalo de 100 mg para este elemento.

Na TAB. 19 são apresentadas as estimativas de massa mínima para os elementos determinados por INAA no estudo de homogeneidade dentro do frasco do material de referência de tecido de ostra. Optou-se por utilizar valores de massa medidos experimentalmente para a definição de massas mínimas.

TABELA 19 - Estimativa de massa mínima do MRC de tecido de ostra, obtida por INAA

Elemento	Massa mínima, g
K	0,050
Mg	0,025
Mn	0,025
Na	0,025
V	0,100

Resultados de massa mínima usuais foram obtidos para V, isto é, 100 mg de amostra. Já para os demais elementos, foi possível demonstrar que amostras com massas menores podem ser utilizadas, sem perda de confiança nos respectivos valores certificados.

Depois de analisado todo os valores obtidos dos materiais de referência, foi realizada a comparação de ambos os materiais com relação a estimativa de massa mínima das amostras do MRC de tecido de mexilhão e tecido de ostra. Na TAB. 20 são apresentadas as estimativas de massa mínima dos MRC utilizados neste estudo, obtidas por INAA.

TABELA 20 - Estimativa de massa mínima dos MRC, obtida por INAA

Elemento	Massa Mínima, g	
	MRC Mexilhão	MRC Ostra
K	0,100	0,050
Mg	0,075	0,025
Mn	0,025	0,025
Na	0,015	0,025
V	0,100	0,100

Apenas os elementos Mn e V apresentaram o mesmo valor de massa mínima no estudo de homogeneidade dentro do frasco por INAA. Para K e Mg, foram observadas massas mínimas menores no MRC de tecido de ostra. Situação inversa foi observada para Na, onde a massa mínima menor foi observada para o MRC de mexilhão. Tais diferenças são esperadas, mesmo para materiais de matriz similar, como é o caso, pois dependem de diversos fatores tais como a concentração dos elementos na amostra e a distribuição de tamanho de partícula.

8 CONCLUSÃO

Neste trabalho foram determinados os elementos K, Mg, Mn, Na e V em amostras de materiais de referência biológicos marinhos, com massas variando de 1 a 250 mg. Observou-se que é possível a aplicação da Análise por Ativação Neutrônica Instrumental ao estudo da homogeneidade dentro do frasco para massas inferiores a 50 mg, com resultados satisfatórios para o material de referência certificado de mexilhão *Perna perna* e o material de referência certificado de tecido de ostra. As massas mínimas de amostra para a determinação dos elementos foram estimadas e variaram de 0,015 g para Na no material de referência de mexilhão a 0,100 g para V nos dois materiais de referência, demonstrando que a homogeneidade dentro dos frascos dos materiais é satisfatória para esses elementos, podendo ser utilizados em técnicas que demandem menor quantidade de amostra.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Conteúdo de certificados de materiais de referência**. 1 ed. Rio de Janeiro: ABNT, 2000 (ABNT ISO Guia 30).

ABNT, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração**. Rio de Janeiro: ABNT, 2005 (NBR ISO/IEC 17025).

ABNT, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Materiais de referência – Princípios gerais e estatísticos para certificação**. 1 ed. Rio de Janeiro: ABNT, 2012 (ABNT ISO GUIA 35).

ALFASSI, Z.B. **Activation Analysis**. v. 01, Florida, FL: CRC Press, 1990.

ALFASSI, Z.B. **Chemical Analysis by Nuclear Methods**. John Wiley & Sons, 1994.

ALPAX, ALPAX COMÉRCIO DE PRODUTOS PARA LABORATÓRIOS LTDA., **Certificado de calibração nº ALR 6830/10**, Balão volumétrico com volume nominal de 10 mL, São Paulo, 2010.

BARBAGALLO, M. Altered cellular magnesium responsiveness to hyperglycemia in hypertensive subjects. **Hypertension**, v. 38, p. 612-615, 2001.

BODE, P.; GOEIJ, J.M. Activation Analysis. In: MEYERS, R.A. **Encyclopedia of Environmental Analysis and Remediation**. John Wiley & Sons, p. 68-84, 1998.

CARDOSO, J.M.; SIMÕES, J.B.; CORREIA, C.M.B.A. Dead-time analysis of digital spectrometers. **Nucl. Instr. Meth. Phys. Res.**, v. A 522, p. 487–494, 2004.

CARDOSO, M.H.W.M. **Preparo de um material de referência certificado para controle de agrotóxicos em hortifrutigranjeiros**. 2008. Tese (Doutorado). Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, São Paulo.

CHU, S.F.Y.; EKSTRÖM, L.P.; FIRESTONE, R.B. **The Lund/LBNL Nuclear Data Search Version 2.0**, 1999. Disponível em: <<http://nucleardata.nuclear.lu.se/toi/>> Acesso em: 20 de outubro de 2016.

CHUI, Q.S.H.; IAMASHITA, C.O.; BISPO, J.M.A. Estudo de homogeneidade de lote de material silício metálico candidato a material de referência. **Quím. Nova**, v. 28, n. 3, p. 497-501, 2005.

CLARK, L. Los valores p y los intervalos de confianza. En qué confiar? **Rev. Pan. Sal. Púb**, v. 15, n. 5, p. 295-296, 2004.

CURRIE, L.A. Detection and quantification limits: origins and historical overview. **Anal. Chim. Acta**, v. 391, p. 127-134, 1999.

CUMMING, G., FINCH, S. Inference by eye: confidence intervals, and how to read pictures of data. **American Psychologist**, v. 60, p. 170-180, 2005.

DAME, R.F. Organismic level processes. In: Ecology of marine bivalves: an ecosystem approach. New York: CRC Press. Cap. 3, p.35-74, 1996.

DONG, M.; LU, J.; YAO, S.; LI, J.; LI, J.; ZHONG, Z.; LU, W. Application of LIBS for direct determination of volatile matter content in coal. *J. Anal. At. Spectrom.* v. 26, p. 2183-2191, 2011.

EHMANN, W.D.; VANCE, D. E. **Radiochemistry and nuclear methods of analysis**. 1. ed. New York, NY: John Willey, 1991.

ESTATCAMP/DIGUP, CONSULTORIA ESTATÍSTICA E QUALIDADE/DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS E CONSULTORIA ESTATÍSTICA. **Teste de Tukey (TSD – Tukey Significant Difference)**. Disponível em: < <http://www.portaaction.com.br/anova/31-teste-de-tukey> > Acesso em: 10. dez. 2016.

EVANGELAU, A.M. Vanadium in cancer treatment. *Oncol. Hematol.*, v. 42, p. 249-265, 2002.

FARRANT, J. **Practical Statistics for the Analysis Scientist**, Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry, 1997.

FEI, T.; DEHONG, L.; FENGQUN, Z.; JUNHUA, L.; HUA, T., XIANGZHONG, K. Determination of trace elements in Chinese medicinal plants by instrumental neutron activation analysis. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, v. 284, p. 507-511, 2010.

GILMORE, G. R. **Practical Gamma-ray Spectrometry**, 2. ed., John Wiley & Sons, Warrington, UK: 2008.

GOSLING, E. **Bivalve molluscs - Biology, ecology and culture**, Oxford, UK: Blackwell, 2003.

GREENBERG R.R.; BODE P.; FERNANDES E.A.N. Neutron activation analysis: A primary method of measurement. *Spectrochim Acta Part B*, v. 66, p. 193-241, 2011.

HAMEL, F.G.; SOLOMON, S.S.; JESPERSEN, A.S.; BLOTCKY, A.; RACK, E.; DUCKWORTH, W.C. Alteration of tissue vanadium content in diabetes. *Metab. Clin. Exp.*, v. 42, n. 12, p. 1503-1505, 1993.

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. 2009.

IAEA, INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Use of research reactors for neutron activation analysis**. Vienna, 2001 (IAEA – TECDOC 1215).

ICH, INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE, **ICH harmonized tripartite guideline, validation of analytical procedures: text and methodology**. Q2(R1). Current Step 4 version. Parent Guideline dated 27 October 1994. Complementary Guideline on Methodology dated 6 November 1996 incorporated in November 2005. Disponível em www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf. Acesso em: 20 de outubro de 2016.

ILAC, INTERNATIONAL LABORATORY ACCREDITATION COOPERATION, **ILAC Guidelines for the Requirements for the Competence of Reference Material Producers**. ILAC G-12, 2000. Disponível: <http://www.ilac.org>. Acesso em: 18 de novembro de 2016.

INMETRO, INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Vocabulário Internacional de Metrologia – Conceitos Fundamentais e Gerais e Termos Associados** (VIM 2008 – JCGM 200:2008), 1 ed. Rio de Janeiro: 2009.

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** (ISO/TR 22971) Geneva, 2005.

KIMURA, C.B.; REIS, C.R., FERNANDES, L.C. Efeito do consumo de água rica em sais de vanádio sobre a glicemia de ratos diabéticos. **Estudos de Biologia**, v. 28, n. 65, p. 87-96, 2006.

LECO Corporation, **AMA254 Advanced Mercury Analyzer**, Specification Sheet 5/08-REV6, 2008. Disponível em: <<http://www.usbioecuador.com/descargas/AMA254-ht.pdf>>. Acesso em: 05/01/2017.

LEO, W.R. **Techniques for Nuclear and Particle Physics Experiments**. Springer-Verlag. Berlin: Germany, 1994

LUZ, R.C.S.; SILVA, L.M.S.; LOPES, G.S.; MARQUES, A.B.; MARQUES, E.P. Determinação de vanádio em óleo diesel por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS). **Rev. Anal.**, n. 7, p. 48-56, 2003.

MARZBAN L., McNEILL J.H. Insulin-like actions of vanadium: potential as a therapeutic agent. **J. Trace Elem. Exp. Med.**, v.16, p. 253-267, 2003.

MEYERS, R.A. **Encyclopedia of Analytical Chemistry**, Chichester, U.K.: John Wiley & Sons, 2000.

MORAES, I.R.; DEL MASTRO, N.L.; JAKABI, M.; GELLI, D.S. Estudo da radiosensibilidade ao ⁶⁰Co do *Vibrio cholerae* O1 incorporado em ostras. **Rev. Saúde Pública**, v. 34, n.1, p.39-32, 2000.

MOREIRA, E.G.; MAIHARA, V.A.; CLAIN, A.F.; FONSECA, A.G.; BRAGANÇA, M.J.C.S.; MARTINELLI, J.R.; VASCONCELLOS, M.B.A. **Produção de material de referência de corvina como suporte ao desenvolvimento metrológico na América Latina**, Projeto CNPq 472328/2011-5, 2012-2014.

MOREIRA, E.G. **Preparo e caracterização de um material de referência de mexilhão Perna perna (Linnaeus, 1759)**. 2010. Tese (Doutorado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

MOREIRA, H.S.; SAIKI, M., VASCONCELLOS, M.B.A. Análise por ativação com nêutrons de fitoterápicos obtidos de plantas medicinais. INTERNATIONAL ATLANTIC NUCLEAR CONFERENCE, Sep. 30 - October 5, 2007, Santos, SP, **Proceedings...** Santos, 2007.

NAP, THE NATIONAL ACADEMIES PRESS-FOOD AND NUTRITION BOARD. **Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium,**

copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc, p. 394-553, 2001.

NIST, NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY, **Certificate of Analysis, SRM 1566b, Oyster tissue**, 2001.

NOMURA, C.S.; SILVA, C.S.; NOGUEIRA, A.R.A.; OLIVEIRA, P.V. Bovine liver sample preparation and micro-homogeneity study for Cu and Zn determination by solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry, **Spectroc. Acta Part B.**, v. 60, p. 673-680, 2005.

OLIVO E. **Significado de los intervalos de confianza para los estudiantes de ingeniería en México**. 2008. Tese (Doutorado). Universidade de Granada, Granada, Espanha.

PAUWELS, J.; DE ANGELIS, L.; GROBECKER, K.H. Solid sampling Zeeman atomic absorption spectrometry in production and use of certified reference material, **Pure Appl. Chem.**, v. 63, p.1199-1204, 1991.

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.

RUSAK, D.A.; CASTLE, B.C.; SMITH, B.W.; WINEFORDNER, J.D. Recent trends and the future of laser-induced plasma spectroscopy. **Trends Anal. Chem.**, v. 17 p. 453–461, 1998.

SILVA, P.S.C. **Caracterização química e radiológica dos sedimentos do estuário de Santos, São Vicente e Baía de Santos**. 2004. Tese (Doutorado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

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.

TSUGANE, T. Salt, salted food intake, and risk of gastric cancer: Epidemiologic evidence. **Cancer Sci.**, v. 96, p. 1-6, 2005.

VASCONCELLOS, M.B.A.; MOREIRA, E.G.; MAIHARA, V.A.; CATHARINO, M.G.M.; SAIKI, M. **Preparo e caracterização de um material de referência de mexilhão**, Projeto FAPESP 06/065567, 2007-2009.

VASCONCELLOS, M.B.A.; MOREIRA, E.G.; MAIHARA, V.A.; CATHARINO, M.G.M.; SOUSA, E.C.P.M.; SAIKI, M. **Preparo e caracterização de um material de referência de mexilhão**, Projeto CNPq 472736/2008-6, 2008-2010.

VORMANN, J. e ANKE, M. Dietary magnesium: supply, requirements and recommendations - results from duplicate and balance studies in man. **J. Clin. Basic Cardiol.**, v. 5, p.49-53, 2002.

WEBER, P. Vitamin K and bone health. **Nutrition**, v. 17, p. 880-87, 2001.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guideline: Sodium intake for adults and children**. Geneva: WHO, 2012.

Yi, C-Y.; JEOUNG, K.; OH, J-J. A method of dead time measurement. **Nucl. Instr. Meth Phys. Res.** v. A 551, p. 352-355, 2005.

ZEISLER, R. Maintaining accuracy in gamma-ray spectrometry at high counting rates. **J. Radioanal. Nucl. Chem.**, v. 244, p. 507-510, 2000.

ZMOZINSKI A.V.; PASSOS, L.D.; DAMIN, I.C.F.; SANTO, M.A.B.E.; VALE, M.G.R.; SILVA, M.M. Determination of cadmium and lead in fresh fish samples by direct sampling electrothermal atomic absorption spectrometry, ***Anal. Methods***, v. 5, p. 6416-6424, 2013.

ZSCHUNKE, A. (Ed.) ***Reference materials in analytical chemistry – a guide for selection and use***. Berlin, Springer, 2000.