

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

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MATERIAL DE
REFERÊNCIA DE FORRAGEIRA PARA NUTRIENTES E
CONTAMINANTES INORGÂNICOS**

CARLA MAÍRA BOSSU*

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

Orientadora: Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira

*** Bolsista CNPq**

São Carlos – SP

2013

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

B746pc

Bossu, Carla Maíra.

Produção e caracterização de material de referência de forrageira para nutrientes e contaminantes inorgânicos / Carla Maíra Bossu. -- São Carlos : UFSCar, 2013.
119 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Química analítica. 2. Material de referência. 3. Plantas forrageiras. 4. Contaminantes inorgânicos. 5. Macronutrientes. 6. Micronutrientes. I. Título.

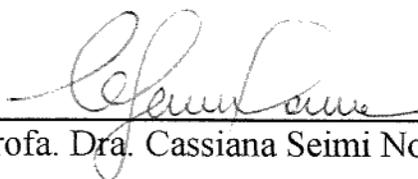
CDD: 543 (20^a)

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

*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de tese de doutorado da candidata **Carla Maíra Bossu**, realizada em 12 de abril de 2013:*



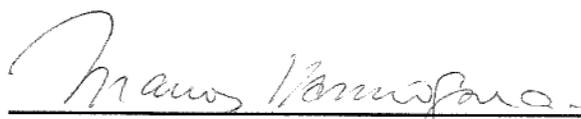
Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira



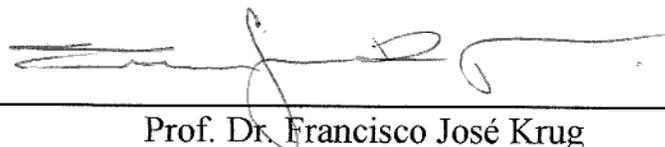
Profa. Dra. Cassiana Seimi Nomura



Profa. Dra. Marina Beatriz Agostini Vasconcellos



Prof. Dr. Marcos Yassuo Kamogawa



Prof. Dr. Francisco José Krug

*“O único lugar onde o
sucesso vem antes do
trabalho é no dicionário”*

Albert Einstein

**Este trabalho é dedicado aos meus pais
Antônio Moacir e Maria de Lourdes e
meus irmãos Carina e Maninho**

Meus amados.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

À Deus por tudo em minha vida e ter me dado essa oportunidade;

À Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira pela orientação, confiança, amizade, incentivo, conselhos, paciência, apoio e consideração demonstrada durante todo o desenvolvimento desse trabalho na Embrapa Pecuária Sudeste;

Ao Prof. Dr. Joaquim Araújo Nóbrega e Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho por toda ajuda, amizade, sugestões, críticas e ensinamentos;

Ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de São Carlos pela oportunidade;

A todos os professores e amigos do DQ/UFSCar que contribuíram para a minha formação acadêmica e apoio institucional;

À Embrapa Pecuária Sudeste pelo espaço e oportunidade concedidos;

Ao CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa concedida;

Ao Dr. Alberto C. de Campos Bernardi pela amizade e ajuda importante no trabalho, principalmente nos estudos em casa de vegetação;

Ao Dr. Marcio A. Bacchi pela amizade, colaboração e importantes sugestões no trabalho;

À Dra. Elisabete A. de Nadai Fernandes pela oportunidade dada a mim em aprender um pouco sobre a técnica de INAA em seu laboratório.

Aos pós-graduandos e estagiários do laboratório de Radioisótopos do CENA, Universidade de São Paulo, em especial a Lilian e a Maria pela colaboração;

Ao Dr. Gilberto Batista de Souza pela amizade, apoio, importantes sugestões e disposição em ajudar;

À Dra. Edilene Cristina Ferreira pela amizade e conhecimentos passados.

Dra. Silvia Helena Gonvoni Brondi e Profa. Dra. Fernanda S. C. Soares por todo apoio e presença amiga em todos os momentos;

Ao Rodrigo por todo carinho, amor, respeito, companheirismo, colaboração, compreensão, incentivo e paciência incondicionais;

À Nayara Alonso Cazo, por toda ajuda e amizade;

Aos funcionários do DQ/UFSCar em especial às funcionárias da secretaria da pós-graduação, Ariane, Cristina e Luciani por toda atenção dada nos serviços burocráticos;

Aos meus amigos de graduação, em especial Roberta, Débora, Ana Carla, Ricardo, Gustavo, Adriana, Marquinhos, Bruno, Grazielle e Juliana pela ótima convivência, amizade, companheirismo, conversas e muitas risadas;

À Adriana Nori, Thiaguinho, Zé, Anielli, Silvéria, Catarinie, Lidiane, Juliana Cobre, Rodolfo, Caio, Patricia, Eveline, Wladiana, Claudinha pela presença amiga em todos os momentos;

Aos funcionários da Embrapa Pecuária Sudeste, Cristina, Victor Gilbertinho, Marcos, Natal, Cidinha, Carlos, Cadu e Flavinha e à estagiária Mariana por todo apoio e auxílio; ao Luiz Trevisan e Mineiro pela ajuda na coleta das forrageiras na casa de vegetação; e a Andrea Shibata pela ajuda na impressão das etiquetas para os frascos.

Aos amigos e companheiros do GAIA: Raquel, Tatiane, Amália, Alexandra, Aline, Alex, Amanda, Amanda Augusto, Clarice, Carol, Emiri, Érica, Isabella, Jozemir, Lucimar, Michelle, Poliana, Renata, Sidnei, Silmara, Silmara Pereira, pela amizade, companheirismo, sugestões e pelos momentos alegres;

A todos os amigos ex-GAIA com os quais tive a oportunidade de conhecer e conviver;

Aos meus maravilhosos pais Antônio Moacir e Maria de Lourdes e irmãos Carina e Antônio Moacir Junior (Maninho) que sempre me apóiam e auxiliam em todos os momentos da minha vida, pelo imenso amor, respeito e paciência. Amo muito vocês.

Muito obrigada

LISTA DE ABREVIATURAS

- AAS** – Espectrometria de Absorção Atômica (Atomic Absorption Spectrometry)
- COMAR** - Banco Internacional de Dados de Materiais de Referência Certificados (International Data Bank of Certified Reference Materials)
- CVAAS** - Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Vapor Frio (Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry)
- EPLNA** - Ensaio de Proficiência de Laboratórios de Nutrição Animal
- ET AAS** – Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica (Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry)
- FAAS** – Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (Flame Atomic Absorption Spectrometry)
- GF AAS** – Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica em Forno de Grafite (Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry)
- HG AAS** – Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Hidretos (Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry)
- HR-ICP-MS** - Espectrometria de Massa com Plasma Acoplado Indutivamente de Alta Resolução (High Resolution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry).
- ICP OES** – Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Acoplado Indutivamente (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry)
- ICP-MS** – Espectrometria de Massa com Plasma Acoplado Indutivamente (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry)
- INAA** - Análise por ativação Neutrônica Instrumental (Instrumental neutron activation analysis)
- IUPAC** – União Internacional de Química Pura e Aplicada (International Union of Pure and Applied Chemistry)
- LA-ICP-MS** – Ablação em Laser com Espectrometria de Massas com Plasma Acoplado Indutivamente (Laser Ablation Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry)
- RM** – Material de Referência (Reference Material)
- CRM** – Material de Referência Certificado (Certified Reference Material)
- Q-ICP-MS** - espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente com quadrupole (Quadrupole Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) e

SS-GFAAS – Análise Direta de Sólidos em Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica em Forno de Grafite (Solid-Sampling Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry)

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.4.1 – Função de macro e micronutrientes presentes no organismo animal e as causas de suas possíveis deficiências.....	21
TABELA 3.4.2 - Principais funções e causas dos contaminantes em animais	22
TABELA 5.1.1 – Resultados da análise do solo para fins de fertilidade.....	29
TABELA 5.2.1 - Concentrações dos contaminantes estudadas nos 16 vasos.....	31
TABELA 5.2.2 - Programa de aquecimento empregado na digestão ácida assistida por radiação micro-ondas.....	32
TABELA 5.2.3 - Programa de aquecimento empregado na digestão ácida assistida por radiação micro-ondas para amostras de solo.....	33
TABELA 5.2.4 - Parâmetros empregados na análise por ICP-MS.....	34
TABELA 5.2.5 - Parâmetros empregados na análise por ICP OES radial.....	35
TABELA 5.4.1 - Programa de aquecimento empregado na digestão ácida assistida por radiação micro-ondas.....	38
TABELA 5.4.2 - Parâmetros empregados na análise por ICP OES.....	38
TABELA 5.9.1 - Participantes do ensaio colaborativo.....	46
TABELA 6.1.1 - Recuperações (%) obtidas para diferentes condições de operação do ICP-MS (n=3).....	51
TABELA 6.1.2 – Média das concentrações dos isótopos (em mg kg ⁻¹), obtidas para os materiais de referência certificados folhas de tomateiro (NIST 1573a) ^a e folhas de pessegueiro (NIST 1547) ^b (n=3).....	52
TABELA 6.1.3 – Valores dos limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), RDS da repetibilidade ^a , RSD da reprodutibilidade ^b e as incertezas de medição (U) para ICP-MS.....	53
TABELA 6.1.4 - Teores de contaminantes na dose 25 mmol/vaso (16 vasos; mg kg ⁻¹ ; n = 4) e valor de peso seco (g) para primeiro e segundo corte.....	54
TABELA 6.3.1 - Resultados e RSD obtidos pelos métodos de digestão assistida por radiação micro-ondas e digestão em bloco digestor para amostra candidata a material de referência, por ICP OES (n=3).....	64
TABELA 6.3.2 - Média das concentrações, obtidas por ICP OES, para os materiais de referência certificados de folhas de tomateiro (NIST 1573a) ^a e folhas de pessegueiro (NIST 1547) ^b (n=3).....	65
TABELA 6.3.3 - Valores dos limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) e	65

as incertezas de medição (U) para amostra de forrageira em ICP OES.....	
TABELA 6.4.1 - Concentrações de As, Cd, Cr, Pb Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn obtidas para diferentes massas de amostra para digestão em micro-ondas com cavidade (n=3).....	66
TABELA 6.4.2 - Estatísticas da ANOVA para os valores médios de cada massa para o estudo de massa mínima de amostra.....	67
TABELA 6.5.1 - Estatísticas da ANOVA para os valores médios de cada frasco obtidos para o estudo de homogeneidade entre os frascos.....	76
TABELA 6.5.1.1 – Concentrações dos elementos, obtidas por INAA para o estudo da homogeneidade entre frascos, com as incertezas associadas e os valores dos limites de detecção (base úmida).....	78
TABELA 6.5.1.2. Estatísticas da ANOVA para os valores médios de cada frasco obtidos por INAA para o estudo de homogeneidade entre os frascos.....	79
TABELA 6.6.1.1 - Estatísticas da ANOVA para os valores médios de cada frasco armazenado a 38 °C e 100% de umidade relativa em comparação com o frasco controle, obtidos por ICP-MS e ICP OES para o estudo de estabilidade a curto prazo.....	87
TABELA 6.6.2.1 - Estatísticas da ANOVA para os valores médios de cada frasco obtidos por ICP MS e ICP OES para o estudo de estabilidade a longo prazo.....	96
TABELA 6.7.1 - Umidade residual no candidato a material de referencia de forrageira determinado em estufa a 105 °C por 12h.....	97
TABELA 6.8.1 – Resultados reportados pelos participantes do ensaio colaborativo para caracterização do candidato a material de referência de forrageira (base seca)	98
TABELA 6.9.2.1 - Estimativas de todas as incertezas obtidas para cada elemento nas concentrações $g\ kg^{-1}$ ou $mg\ kg^{-1}$ correspondentes (base seca)....	106
TABELA 6.9.2.2 - Valores de referência atribuídos aos elementos determinados no RM de forrageira ($g\ kg^{-1}$ ou $mg\ kg^{-1}$) acompanhado da incerteza expandida (U_{MR}) em porcentagem (base seca).....	107
TABELA 6.9.2.3 – Valores de referência atribuídos aos elementos determinados na forrageira ($g\ kg^{-1}$ ou $mg\ kg^{-1}$) acompanhado da incerteza expandida (U_{RM}) em porcentagem, obtidos por INAA (base seca).....	108

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 3.1.1 - Fluxograma sobre todas as etapas e o calculo das incertezas (U_{CRM}) que devem ser realizadas para obtenção de um material de referência certificado.....	11
FIGURA 5.1.1 - Vasos plantados com forrageira <i>Brachiaria brizantha</i> Stapf. cv. Marandu, instalados em casa de vegetação.....	30
FIGURA 5.1.2 - Exemplo de vaso com a semente de <i>Brachiaria brizantha</i> Stapf. cv. Marandu.....	30
FIGURA 5.1.3. (a) <i>Brachiaria brizantha</i> Stapf. cv. Marandu após 2 meses e (b) realização do primeiro corte.....	31
FIGURA 5.7.1.1 - Procedimento utilizado para a realização de teste de estabilidade a curto prazo.....	43
FIGURA 6.1.1 - (a) após 7 dias de adição da dose 50 mmol por vaso; (b) após 30 dias de adição na dose 50 mmol por vaso.....	48
FIGURA 6.1.2 - Produção de massa seca nas doses 0; 12,5; 25 e 50 mmol por vaso.	49
FIGURA 6.1.3 - Produção da massa seca da parte aérea da forrageira (cortes 1, 2, 3, 4, 5, 6).....	50
FIGURA 6.1.4 - Somatória da produção da massa seca da parte aérea da forrageira dos cortes 1, 2, 3, 4, 5, 6.....	50
FIGURA 6.1.5 Teor extraível de arsênio na parte aérea ao longo dos seis cortes estudados.....	55
Figura 6.1.6 Teor extraível de cádmio na parte aérea ao longo dos seis cortes estudados.....	56
Figura 6.1.7 Teor extraível de chumbo na parte aérea ao longo dos seis cortes estudados.....	57
Figura 6.1.8 - Teor extraível de cromo na parte aérea ao longo dos seis cortes estudados.....	58
Figura 6.1.9 - Teor extraível de As, Cd, Cr e Pb no caule após o sexto corte.....	58
Figura 6.1.10 - Teor extraível de As, Cd, Cr e Pb na raiz após o sexto corte.....	59
Figura 6.1.11 - Teores em $mg\ kg^{-1}$ de As, Cd, Cr e Pb no solo após o sexto corte.....	60
FIGURA 6.2.1.1 - Distribuição do tamanho de partícula para o material candidato a material de referência após moagem em moinho de facas (com	61

peneira de 500 µm).....	
FIGURA 6.2.1.2 - Distribuição do tamanho de partícula para o material candidato a material de referência para peneira de 250 µm.....	62
FIGURA 6.2.1.3 - Distribuição do tamanho de partícula para o material candidato a material de referência.....	63
FIGURA 6.5.1 - Homogeneidade entre os frascos e dentro do frasco para cádmio (base úmida).....	69
FIGURA 6.5.2 - Homogeneidade entre os frascos e dentro do frasco para cromo (base úmida).....	69
FIGURA 6.5.3 - Homogeneidade entre os frascos e dentro do frasco para chumbo (base úmida).....	70
FIGURA 6.5.4. Homogeneidade entre os frascos e dentro do frasco para arsênio (base úmida).....	70
FIGURA 6.5.5 - Homogeneidade entre os frascos e dentro do frasco para cálcio (base úmida).....	71
Figura 6.5.6 - Homogeneidade entre os frascos e dentro do frasco para potássio (base úmida).....	71
FIGURA 6.5.7 - Homogeneidade entre os frascos e dentro do frasco para fósforo (base úmida).....	72
FIGURA 6.5.8 - Homogeneidade entre os frascos e dentro do frasco para magnésio (base úmida).....	72
FIGURA 6.5.9 - Homogeneidade entre os frascos e dentro do frasco para zinco (base úmida).....	73
FIGURA 6.5.10 - Homogeneidade entre os frascos e dentro do frasco para sódio (base úmida).....	73
FIGURA 6.5.11 - Homogeneidade entre os frascos e dentro do frasco para manganês (base úmida).....	74
FIGURA 6.5.12 - Homogeneidade entre os frascos e dentro do frasco para ferro (base úmida).....	74
Figura 6.5.13 - Homogeneidade entre os frascos e dentro do frasco para cobre (base úmida).....	75
FIGURA 6.6.1.1 - Estabilidade a curto prazo para cádmio (base úmida).....	80
FIGURA 6.6.1.2 - Estabilidade a curto prazo para cromo (base úmida).....	81
FIGURA 6.6.1.3 - Estabilidade a curto prazo para chumbo (base úmida).....	81

FIGURA 6.6.1.4 - Estabilidade a curto prazo para arsênio (base úmida).....	82
FIGURA 6.6.1.5 - Estabilidade a curto prazo para cálcio (base úmida).....	82
FIGURA 6.6.1.6 - Estabilidade a curto prazo para potássio (base úmida).....	83
FIGURA 6.6.1.7 - Estabilidade a curto prazo para fósforo (base úmida).....	83
FIGURA 6.6.1.8 - Estabilidade a curto prazo para magnésio (base úmida).....	84
FIGURA 6.6.1.9 - Estabilidade a curto prazo para zinco (base úmida).....	84
FIGURA 6.6.1.10 - Estabilidade a curto prazo para sódio (base úmida).....	85
FIGURA 6.6.1.11 - Estabilidade a curto prazo para manganês (base úmida).....	85
FIGURA 6.6.1.12 - Estabilidade a curto prazo para ferro (base úmida).....	86
FIGURA 6.6.1.13 - Estabilidade a curto prazo para cobre (base úmida).....	86
FIGURA 6.6.2.1 - Estabilidade a longo prazo para cádmio (base úmida).....	89
FIGURA 6.6.2.2 - Estabilidade a longo prazo para cromo (base úmida).....	89
FIGURA 6.6.2.3 - Estabilidade a longo prazo para chumbo (base úmida).....	90
FIGURA 6.6.2.4 - Estabilidade a longo prazo para arsênio (base úmida).....	90
FIGURA 6.6.2.5 - Estabilidade a longo prazo para cálcio (base úmida).....	91
FIGURA 6.6.2.6 - Estabilidade a longo prazo para potássio (base úmida).....	91
FIGURA 6.6.2.7 - Estabilidade a longo prazo para fósforo (base úmida).....	92
FIGURA 6.6.2.8 - Estabilidade a longo prazo para magnésio (base úmida).....	92
FIGURA 6.6.2.9 - Estabilidade a longo prazo para zinco (base úmida).....	93
FIGURA 6.6.2.10 - Estabilidade a longo prazo para sódio (base úmida).....	93
FIGURA 6.6.2.11 - Estabilidade a longo prazo para manganês (base úmida).....	94
FIGURA 6.6.2.12 - Estabilidade a longo prazo para ferro (base úmida).....	94
FIGURA 6.6.2.13 - Estabilidade a longo prazo para cobre (base úmida).....	95
FIGURA 6.7.1 - Teste de umidade previamente realizado.....	97
FIGURA 6.8.1 - Valores obtidos do índice z para o ensaio colaborativo.....	101

RESUMO

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MATERIAL DE REFERÊNCIA DE FORRAGEIRA PARA NUTRIENTES E CONTAMINANTES INORGÂNICOS. O objetivo do trabalho foi produzir material candidato a material de referência nacional de forrageira *Brachiaria brizantha* Stapf. cv. Marandu, contendo teores conhecidos de contaminantes (Cr, Pb, Cd e As) e de macro e micronutrientes (Ca, P, Mg, K, Cu, Fe, Mn, Zn e Na). Foram montados 400 vasos com solo coletado da fração 0-20 cm, o qual foi corrigido com calcário e N, P e K antes do plantio. Foi feito um estudo prévio em 16 vasos, para a definição de doses de contaminantes que não prejudicasse de forma crítica a produção de matéria seca, sendo definida a dose de 25 mmol/vaso de Cr, Pb, Cd e As, adicionados na forma de sais, a cada um dos 375 vasos restantes. Após aproximadamente 60 dias foi feito o primeiro corte da planta forrageira, sendo o segundo corte realizado após 120 dias. Após secagem em estufa a 45 °C e moagem em moinho de facas seguido de segunda moagem em moinho ultra-centrífugo, obteve-se aproximadamente 20 kg de material seco e moído. Após essa etapa foi realizada a homogeneização em homogeneizador tipo Y, envase, irradiação com raios gama na faixa de dosagem entre 5 e 10 kGy, visando ao aumento do tempo de prateleira e ao mesmo tempo a preservação das características originais da amostra. Em seguida realizou-se os estudos pertinentes, tais como: distribuição de tamanho de partícula, estudos de homogeneidade intra e inter-amostral e estudos de estabilidade a curto e longo prazo utilizando técnicas de espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) para As, Cd, Cr e Pb e espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) para Ca, P, Mg, K, Cu, Fe, Mn, Zn e Na. Foi feito também estudo de umidade relativa e realizado estudo da homogeneidade inter-amostral utilizando análise por ativação neutrônica instrumental (INAA). Os resultados apresentaram médias dentro do intervalo de confiança de 95%, assegurando homogeneidade e estabilidade do material candidato a material de referência de forrageira. Os valores de consenso para os 13 elementos foram determinados por meio de ensaio colaborativo. Todos estes experimentos foram realizados em conformidade com as ISO Guias 30 a 35.

ABSTRACT

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF FORAGE REFERENCE MATERIAL FOR NUTRIENTS AND INORGANIC CONTAMINANTS. The main aim of this work was to produce a candidate material for national reference material, the forage *Brachiaria brizantha* Stapf. cv. Marandu, containing known levels of contaminants (Cr, Pb, Cd, and As) and macro and micronutrients (Ca, P, Mg, K, Cu, Fe, Mn, Zn and Na). *Brachiaria brizantha* Stapf cv. Marandu was shown in 400 pots containing 25 kg of soil. The pots were kept in a greenhouse at Embrapa Southeast Livestock located in São Carlos, SP. A previous study was conducted in order to establish an appropriate concentration of contaminants that would not harm the dry matter production critically. In order to produce a reference material containing inorganic contaminants in its structure, the dose of 25 mmol/pots was chosen and added into 375 pots. The first harvest occurred after approximately 60 days of plant growth, and the second one after 120 days. Then, the samples were oven-dried at 45°C for 72 hours and grounded first in a cutting mill and then in an ultra-centrifugal mill to reduce particle size. It was produced 20 kg of dried and grounded material. After this, the homogenization and other processes were carried out, including packaging and gamma irradiation dosage in the range of 5-10 kGy to increase the shelf life. Other relevant studies were also undertaken, such as: particle size distribution, between-bottles and within-bottle homogeneity evaluation, short and long term stability tests using ICP-MS techniques for As, Cd, Cr and Pb, and ICP OES for Ca, P, Mg, K, Cu, Fe, Mn, Zn and Na. Relative humidity and homogeneity between-bottles were also carried out using INAA. All tests presented results within the range of 95%, assuring homogeneity and stability of the candidate material for forage reference material. The consensus values for the 13 elements were determined by collaborative program. All these experiments were performed in accordance with the ISO Guides 30 to 35.

SUMÁRIO

1 – Introdução	1
2 – Objetivos	5
3 – Revisão Bibliográfica	7
3.1 - Materiais de Referência Certificado e Materiais de Referência.....	8
3.2 - Breve histórico da produção de material de referência.....	11
3.3 - Materiais de Referência no Brasil.....	15
3.4 - Forrageira.....	19
4 – Material e Métodos	24
4.1 – Instrumentação.....	25
4.2 – Reagentes e Soluções.....	26
4.3 – Descontaminação dos materiais.....	26
4.4 – Amostras e materiais de referência certificados.....	27
5 – Procedimento Experimental	28
5.1 – Montagem do experimento em casa de vegetação.....	29
5.2 – Avaliação de diferentes doses dos contaminantes (As, Pb, Cd e Cr)	31
5.3 – Preparo do material candidato a material de referência.....	35
5.3.1 - Estudo da distribuição do tamanho de partícula.....	36
5.4 - Preparo de amostra para o bloco digestor e micro-ondas em determinação por ICP OES.....	36
5.5 - Estimativa da massa mínima da amostra candidata a material de referência	39
5.6 - Avaliação da homogeneidade dentro e entre frascos.....	39
5.6.1 - Avaliação da homogeneidade entre frascos através da análise por ativação neutrônica instrumental (INAA).....	40
5.7 - Estudo de estabilidade do candidato a material de referência.....	42
5.7.1 - Estudo de estabilidade a curto prazo.....	42
5.7.2 - Estudo de estabilidade à longo prazo.....	43
5.8 - Determinação da Umidade Residual.....	44
5.9 - Ensaio colaborativo.....	45
6 – Resultados e Discussão	47
6.1 - Avaliação de diferentes doses dos contaminantes (As, Pb, Cd e Cr).....	48
6.2 – Preparo do material candidato a material de referência.....	61
6.2.1 - Estudo da distribuição do tamanho de partícula.....	61
6.3 - Preparo de amostra para o bloco digestor e micro-ondas em determinação	63

por ICP OES.....	
6.4 - Estimativa da massa mínima da amostra candidada a material de referência	66
6.5 - Avaliação da homogeneidade dentro e entre frascos.....	68
6.5.1 Avaliação da homogeneidade entre frascos através da análise por ativação neutrônica instrumental (INAA).....	76
6.6 - Estudo de estabilidade do candidato a material de referência	79
6.6.1 - Estudo de estabilidade a curto prazo.....	79
6.6.2 - Estudo da estabilidade a longo prazo.....	87
6.7 - Determinação da Umidade Residual.....	96
6.8 - Ensaio colaborativo.....	97
6.9 - Determinação das incertezas.....	102
6.9.1 - Estimativa das incertezas.....	102
6.9.2 - Atribuição dos valores de propriedades e incertezas obtidas.....	105
7 – Conclusões	109
8 – Referências Bibliográficas	111

Capítulo 1

Introdução

1 – Introdução

Quando um produto brasileiro tem qualidade adequada e ao ser exportado é acusado de contaminação com algum elemento tóxico, por exemplo, é necessário dispor de laboratórios nacionais com competência demonstrada e reconhecida internacionalmente para contra-argumentar à altura. Do lado oposto, é igualmente importante demonstrar que determinado produto estrangeiro não tem condições adequadas, evitando uma importação indesejada. O nível de desenvolvimento da metrologia é um dos principais parâmetros para se avaliar a capacidade tecnológica de um país. Na experimentação científica as descobertas são quase sempre dependentes de algum tipo de medição, sendo importante que os resultados sejam rastreáveis a uma referência confiável, para que as conclusões sejam merecedoras de crédito. O domínio da metrologia em química também traz credibilidade para o país e dá suporte ao comércio internacional (TAGLIAFERRO, 2003).

Dessa forma, existe uma atenção especial dada a novos materiais de referência de melhor qualidade para maior precisão dos equipamentos de medição e da necessidade de dados mais exatos e confiáveis nas disciplinas científicas e tecnológicas (ABNT, 2004). A credibilidade dos resultados das análises químicas quantitativas torna-se fundamental para cada propósito pretendido, garantindo, assim, a rastreabilidade e comparabilidade dos resultados. Logo, para que essa confiabilidade seja alcançada, o laboratório deve ter procedimentos de qualidade e certificação. Tais medidas incluem o uso de métodos de análise validados, o uso de procedimentos internos de controle de qualidade com o emprego de material de referência (RM) e material de referência certificado (CRM), além de procedimentos externos de controle de qualidade, tais como a participação em ensaios de proficiência (EURACHEM/CITAC, 2002).

Segundo definições metrológicas descritas no Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM, 2012), os materiais de referência são amostras que possuem um ou mais valores de propriedades suficientemente homogêneos e bem estabelecidos, de maneira a poderem ser empregados na calibração de um instrumento de medição, na validação de um método analítico, ou na atribuição de valores a um dado material. Por sua vez, o material de referência certificado (CRM) é um “material de referência acompanhado de documentação emitida por uma

entidade qualificada, fornecendo valores de uma ou mais propriedades especificadas e as incertezas e rastreabilidades associadas, usando procedimentos válidos”

Uma vez que o material de referência permite que os resultados gerados por um laboratório sejam transferidos através de uma rede de calibração, a rastreabilidade também pode ser assegurada (ABNT, 2000a).

É de grande importância que o material de referência tenha um grau de similaridade alto com a matriz a ser pesquisada, visando refletir neste padrão os mesmos problemas analíticos que seriam observados em uma amostra real (ABNT, 2002b). A partir daí, tem-se que os materiais de referência e materiais de referência certificados estão diretamente relacionados à garantia da qualidade, uma vez que minimizam os erros que podem ser cometidos em uma quantificação (ABNT, 2004).

Segundo o COMAR (Banco Internacional de Dados de Materiais de Referência Certificados), existem cerca de 11.300 CRMs disponíveis no mercado em diversas matrizes (clínicas, ambientais, matéria-prima) e aproximadamente 400 destes materiais são voltados à agropecuária (<http://www.comar.bam.de/en/>).

Considerando a importância cada vez maior a respeito do controle ambiental e do controle da qualidade dos alimentos e que a análise laboratorial é um componente essencial da área da ciência que se baseia no sistema de segurança alimentar, os laboratórios analíticos devem estar aptos a realizar esse controle (NAMIENIK e ZYGMUNT, 1999).

Apesar da vital importância das medições químicas no setor de agricultura e alimentos, o Brasil ainda não produz CRMs de matrizes de forrageiras para atender à demanda destes setores do agronegócio. Para isso, uma das necessidades é a disponibilização no país de materiais de referência, área ainda incipiente, sendo que a grande maioria dos materiais é importada, o que demanda custos elevados e dificuldades na importação. Conseqüentemente, a aquisição destes materiais depende da importação de produtores internacionais como: National Institute of Standards and Technology (NIST; Gaithersburg, MD, USA) e o Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM; Geel, Belgium), que os comercializam a custos elevados. Ainda, as dificuldades de importação considerando o desembaraço alfandegário, devem ser consideradas, o qual, muitas vezes demora na liberação do CRM, chegando às mãos do comprador próximo do prazo de validade ou até mesmo com este prazo expirado. Além disso, muitas vezes

esse material de referência certificado importado não representa de forma segura uma amostra que deve ser analisada no Brasil.

Considerando a importância da disponibilização no país de materiais de referência, e a disponibilidade encontrada a partir do Ensaio de Proficiência de Laboratórios de Nutrição Animal (EPLNA), programa interlaboratorial de controle de qualidade para Laboratórios de Nutrição Animal coordenado pela Embrapa Pecuária Sudeste desde 1997, com representatividade e abrangência em todas as regiões brasileiras e todas as cadeias ligadas à área (SOUZA et al., 2009), pretende-se preparar amostra de forrageira conhecida como *Brachiaria brizantha* Stapf. cv. Marandu, como amostra candidata a material de referência.

A *Brachiaria brizantha* é uma forrageira bem adaptada a solos de baixa fertilidade, responde bem à adubação e apresenta grande facilidade de manejo. O consumo de matéria seca das pastagens está diretamente ligado ao desempenho dos animais, porque indica a quantidade de nutrientes ingeridos, necessários à manutenção e produção animal (LIMA et al., 2001).

Capítulo 2

Objetivos

2 – Objetivos

O presente trabalho teve por objetivo preparar um material de referência nacional de forrageira para futura distribuição a laboratórios de nutrição animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e outros laboratórios nacionais.

2.2 - Objetivos Específicos:

Produzir material de referência de *Brachiaria brizantha* Stapf. cv. Marandu contendo teores conhecidos dos seguintes analitos: os contaminantes Cr, Pb, Cd e As e os macro e micronutrientes Ca, P, Mg, K, Cu, Fe, Mn, Zn e Na, expressos com base na matéria seca a 105° C, baseada em requisitos estabelecidos internacionalmente por ISO Guias 30 a 35.

Capítulo 3

Revisão Bibliográfica

3 – Revisão Bibliográfica

3.1 – Materiais de Referência Certificado e Materiais de Referência

A realização das trocas de mercadorias, através dos valores verdadeiros dos produtos, representa um dos aspectos que contribui para o crescimento econômico de um país e demonstra a importância de se ter resultados analíticos e ensaios químicos com qualidade e confiabilidade metrológica (ZSCHUNKE, 2000).

A qualidade dos resultados das medições de análise tem sido o centro de interesse de analistas químicos. Isto é causado pela crescente importância desses resultados em quase todas as esferas da vida. Há muitos parâmetros que contribuem para a obtenção de resultados de medição confiáveis e comparáveis. Isto implica, entre outras coisas, competência do analista ou do laboratório, verificações de rotina de exatidão e precisão, validação de métodos analíticos, a acreditação dos laboratórios, materiais de referência (RM), especificamente os materiais de referência certificados (CRM), que são ferramentas muito importantes e a base da obtenção de resultados de medições precisos e verificação de resultados de medições analíticas (KUPIEC et al., 2009).

Visando à confiabilidade de resultados, o papel dos CRMs nas análises químicas é fornecer referências metrológicas visando assegurar a rastreabilidade das medições. A inserção das questões da Metrologia, ciência que se dedica ao aprimoramento de medições em todas as áreas do conhecimento, tem impulsionado o químico analista a se defrontar com o estabelecimento da rastreabilidade às medições geradas em seus experimentos e ensaios (DE BIÈVRE, 2010).

A rastreabilidade é requisito importante para a garantia da qualidade dos dados analíticos nos mercados nacionais e internacionais. O significado da palavra “rastreabilidade metrológica” está nos termos do Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM, 2012) e corresponde à *“propriedade do resultado de uma medição estar relacionado a referências estabelecidas, geralmente padrões nacionais e internacionais, através de uma cadeia contínua de comparações, todas tendo as incertezas estabelecidas”*. A rastreabilidade de uma medida pode ser obtida a partir da combinação de equipamentos de medição calibrados com padrões que possuem sua rastreabilidade garantida ao Sistema Internacional (SI). Caso não

existam métodos primários, é indicado que o método adotado para a medida analítica seja comparado ao primeiro; os métodos utilizados tenham sua validade demonstrada e seja feito o uso de materiais de referência de controle interno ou material de referência certificado de uma matriz que tenha alto grau de similaridade com a amostra em estudo (EURACHEM/CITAC, 2002). Segundo DE BIÈVRE (2010), uma vez que uma cadeia de rastreabilidade metrológica é estabelecida, não se pode inverter a interpretação da sequência de operações após a medição. Assim, essa cadeia de rastreabilidade metrológica é realmente muito útil em qualquer modelo de medição, porque é unidirecional fazendo tal raciocínio visível.

Na rotina de um laboratório de análises químicas são necessários padrões que contêm valores próximos aos esperados e que se relacionem com as propriedades de interesse, em diferentes matrizes reais. Esses padrões podem ser os Materiais de Referência (RMs). Todos os materiais que tenham estabilidade e homogeneidade adequadas para controle da qualidade de uma medição pertencem à família dos RMs. Aqueles que não são acompanhados de um certificado são, em geral, denominados materiais de referência não certificados. Mas também são utilizados muitos outros termos como materiais produzidos internamente, materiais de controle do laboratório e materiais de referência do laboratório (EMMONS et al., 2006).

Em geral, os materiais são certificados por procedimentos especiais, sob supervisão de um órgão independente e competente. Quando não estão disponíveis métodos primários, são utilizados programas interlaboratoriais especialmente planejados para esse fim (ABNT, 2004). Segundo a ABNT ISO Guia 30 (2000a), a certificação de um RM seria o *“procedimento que estabelece o valor de uma ou mais propriedades da substância por um procedimento que assegura a rastreabilidade à compreensão exata das unidades nas quais os valores são expressos e que levam a emissão de um certificado”*. Já o certificado de material de referência seria o *“documento que acompanha um material de referência certificado, declarando um ou mais valores de propriedade e suas incertezas e confirmando que os procedimentos necessários foram realizados para assegurar sua validade e rastreabilidade”*.

Os RMs e CRMs estão entre as ferramentas mais utilizadas e são designados como os padrões a serem utilizados em Química Analítica, sendo frequentemente utilizados na verificação de método, avaliação da eficiência dos

resultados obtidos, validação de método, estimativa das incertezas de uma medição, calibração, trabalhos de pesquisa e desenvolvimento, atividades de controle interno da qualidade e para fins de garantia externa da qualidade. Se vários laboratórios conseguem atingir o mesmo resultado analítico para um mesmo material de referência certificado, isto mostra que as suas medições são comparáveis (ZSCHUNKE, 2003; ABNT, 2004; ABNT, 2000a).

As normas ISO Guias 30 a 35 fornecem orientações aos produtores de materiais de referência, onde são abordadas práticas de garantia da qualidade e rastreabilidade do material preparado (ABNT, 2000a, 2000b, 2002a, 2002b, 2004; ISO, 2006).

As quatro etapas que compõem os trabalhos para obtenção de materiais de referência sólidos consistem resumidamente em: preparar o material na granulometria desejada; distribuí-lo em frascos e verificar se a homogeneidade do material nos frascos é assegurada; fazer o teste para estabelecer o tempo de estabilidade que poderá ser garantido ao material embalado e a ser mantido em estoque (LINSINGER et al., 2001). Além da homogeneidade e estabilidade da amostra, deve-se obter também a caracterização através de comparações interlaboratoriais, que auxiliam na organização, desempenho e avaliação de ensaios nos mesmos itens ou em itens de ensaio similares, por dois ou mais laboratórios, de acordo com condições pré-determinadas (ABNT, 1999). Para os produtores de materiais de referência, as execuções de ensaios interlaboratoriais são muito importantes para estimativa do valor mais provável de uma grandeza. Esse valor pode ser obtido, entre outras formas, através dos valores do consenso dos participantes do ensaio colaborativo (THOMPSON et al, 2006).

Uma definição de incerteza de medição seria *“um parâmetro associado a um resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão de valores que poderiam ser razoavelmente atribuídas ao mensurando”* (VIM, 2012). Desta forma, a determinação da incerteza implica em uma maior confiança na validade do resultado da medição (EURACHEM/CITAC, 2002).

A abordagem das incertezas em medições químicas, conforme indicada na norma ISO 35 (2006), menciona sobre os procedimentos para a certificação de materiais de referência e mostra a importância de se obter as incertezas em todas as etapas de sua preparação e assim contribui para o valor da incerteza final que acompanha o valor de propriedade de um determinado material.

A Figura 3.1.1 abaixo mostra um fluxograma sobre as etapas de preparo e o cálculo da incerteza (U_{CRM}) que devem ser realizadas para obtenção de um material de referência certificado (VAN DER VEEN et al., 2001).

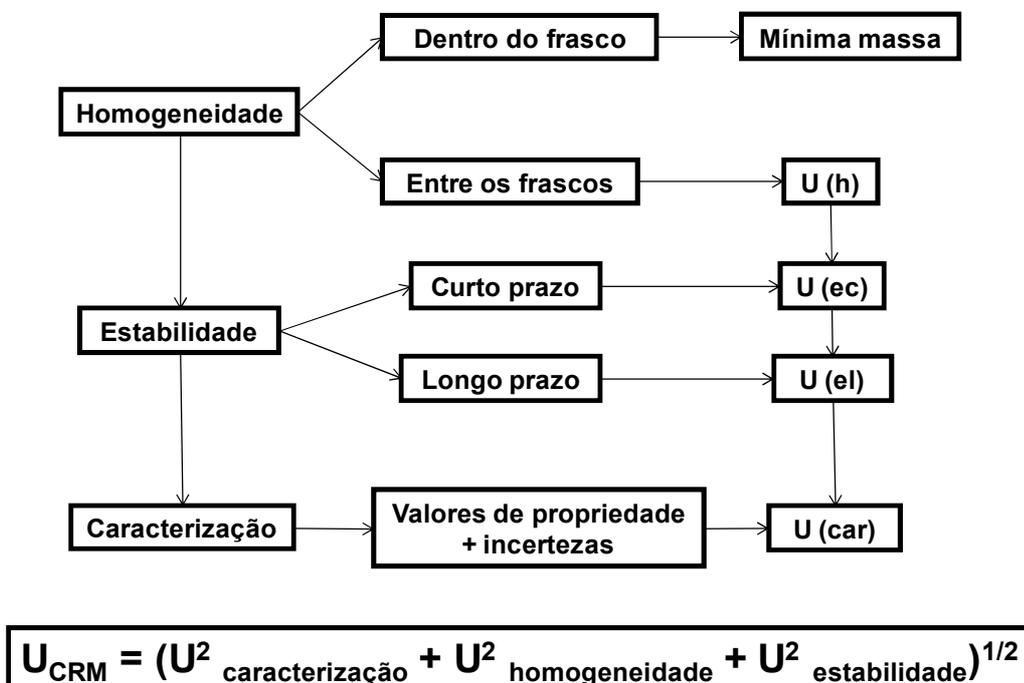


FIGURA 3.1.1 - Fluxograma sobre todas as etapas e o cálculo das incertezas (U_{CRM}) que devem ser realizadas para obtenção de um material de referência certificado.

3.2 - Breve histórico da produção de materiais de referência

Em relação ao aspecto histórico dos materiais de referência, este está relacionado ao desenvolvimento da Química Analítica. No século 19, devido à inexistência de padrões primários, era comum o uso de reagentes purificados ou de baixa pureza como padrões. Por exemplo, em 1824 Gay-Lussac, utilizou como padrão um óxido de As (III) purificado. Assim, houve um aumento nas pesquisas por padrões que pudessem ser empregados nos processos de controle de qualidade de produtos. Já na década de 1880 em Londres, o primeiro material de referência de matriz biológica foi o leite, assim, a análise de gordura no leite foi importante devido à existência da adulteração por diluição com água (STOEPLER, 2001).

No começo do século 20, foram produzidos materiais de referência para ferro e aço, considerados os primeiros materiais de referência europeus de matrizes estáveis, na Alemanha e Reino Unido (PAUWELS e LAMBERTY, 2001).

Fundado em 1901 devido à crescente demanda de vários tipos de padrões por parte das indústrias em rápido desenvolvimento, o *National Institute of Standard and Technology* (NIST, Gaithersburg, MD, USA), antigo *US National Bureau of Standards* (NBS), é um dos maiores centros produtores e fornecedores de RMs da atualidade, e em 1951, iniciou a produção de materiais de referência para análises químicas de minério, metais e cerâmicas (GILLS et al., 2001; PAUWELS e LAMBERTY, 2001). Em 1958, a colaboração europeia nesta área começou dentro do Grupo de Trabalho 20 da European Coal and Steel Community (ECSC) que originou os materiais de referência “EURONORM”. Ainda hoje existem cerca de 200 materiais EURONORM, relacionados também a metais, ligas, minérios. Em 1950, houve a criação dos materiais de referência nucleares e isotópicos nos centros nucleares de Atomic Energy Research Establishment (Reino Unido), Commissariat à l’Energie Atomique (França) e o Central Bureau for Nuclear Measurements (CBNM-Bélgica) (PAUWELS e LAMBERTY, 2001; STOEPLER, 2001). Em 1993, o CBNM mudou para Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM-Bélgica), apresentando medições de alta exatidão e precisão de materiais nucleares com espectrometria de massa. Pode-se observar que neste início de produção de materiais de referência, a maior preocupação estava direcionada a produção de metais e minérios ou na forma sintética, como materiais isotópicos, sendo que a caracterização era realizada através de comparações interlaboratoriais (PAUWELS e LAMBERTY, 2001).

Comercialmente, os primeiros RMs de matriz biológica e ambiental foram produzidos respectivamente nos anos de 1950 e 1960 (STOEPLER, 2001).

Nos anos 70, o Bureau Communautaire de Référence (BCR) foi criado pela Comissão Europeia, iniciando-se a produção dos primeiros materiais de referência não-nucleares europeus, denominados “BCR CRMs”, que consistiam de materiais verdadeiros retirados da produção industrial ou misturas sinteticamente produzidas, caracterizadas por métodos “definitivos”, como preparação gravimétrica, espectrometria de massa por diluição isotópica e coulometria, também caracterizados por comparações interlaboratoriais. Com os problemas ambientais nos anos 80, a certificação destes materiais teve seu foco voltado para ações que garantissem a sua homogeneidade e assegurassem sua estabilidade, o que levou ao estabelecimento, com apoio do BCR, de instalações dedicadas de grande capacidade de produção para candidatos a materiais de referência biológicos e ambientais no CBNM. Esta preocupação resultou na obtenção dos materiais de

referência certificados para análises ambientais de composto orgânicos, espécies químicas, compostos organo-metálicos, alimentos, análises clínicas e biotecnológicas. Os resultados desses investimentos são hoje refletidos nas normas ISO Guia 34 e 35 (PAUWELS e LAMBERTY, 2001).

Atualmente, no panorama mundial, existem vários trabalhos relacionados à produção de materiais de referência.

CAROLI et al. (2000) fizeram um estudo piloto para a produção de um material de referência para elementos traços em mel. Os elementos considerados foram As, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Sn, V e Zn. Foram utilizadas para a determinação dos elementos espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES), espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente com quadrupolo (Q-ICP-MS) e espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente de alta resolução (HR-ICP-MS). Cd e Cr foram quantificados por HR-ICP-MS; Ni, Pb, Sn e V por Q-ICP-MS e HR-ICP-MS; Fe por ICP OES e HR-ICP-MS e Cu, Mn e Zn pelas três técnicas. Como resultados, o material apresentou alguns problemas de estabilidade a longo prazo, mas houve homogeneidade e facilidade de tratamento.

Foi desenvolvido também um candidato a material de referência para determinação de chumbo em osso (HETTER et al., 2008). Esse material foi desenvolvido para permitir uma avaliação interlaboratorial, validação do método, e para calibração de técnicas de amostragem sólidas, como a ablação em laser com espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (LA-ICP-MS). O teste de homogeneidade foi realizado por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ET AAS).

SCHARF e colaboradores (2010) certificaram elementos traços e pentaclorofenol para material de referência de madeira. Esse trabalho foi realizado para apoiar a melhoria no controle de qualidade na análise de resíduos de madeira. O material de referência de madeira foi certificado em frações em massa de arsênio, cádmio, cromo, cobre, chumbo, mercúrio e pentaclorofenol (PCP). As medições de certificação foram realizadas nos laboratórios selecionados com perícia documentada para análise de resíduos de madeira. Os valores certificados e os seus correspondentes incertezas foram atribuídos em plena conformidade com os requisitos da ISO Guia 35. As frações de massa certificadas e suas incertezas expandidas ($k = 2$) são: $3,1 \pm 0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ para As; $3,02 \pm 0,24 \text{ mg kg}^{-1}$ para Cd; $36,4$

$\pm 2,6 \text{ mg kg}^{-1}$ para o Cr; $22,9 \pm 1,7 \text{ mg kg}^{-1}$ para o Cu; $0,60 \pm 0,14 \text{ mg kg}^{-1}$ para o Hg; $39 \pm 4 \text{ mg kg}^{-1}$ para o Pb, e $7,9 \pm 0,6 \text{ mg kg}^{-1}$ para o PCP. O material certificado está disponível como material de referência europeu ERM®-CD100.

OSTERMANN et al (2011) estudou a homogeneidade e estabilidade realizados por fluorescência de raios-X em novo material de referência BAM-H010. Esse material de referência consiste em um tipo de polímero conhecido como terpolímero de acrilonitrilo-butadieno-estireno (ABS), um novo material polimérico de referência certificada. O material de referência possivelmente foi dopado com diferentes teores dos elementos Br, Cd, Cr, Hg e Pb. O monitoramento desses elementos é exigido na União Européia e foi demonstrada que a contribuição da incerteza e a estabilidade térmica de longa duração foram insignificantes em comparação com a contribuição para a incerteza causada pelo método utilizado para a caracterização do teor elementar e a não homogeneidade do lote.

MEISEL & KANE (2011) produziram um artigo de revisão sobre a futura demanda por materiais de referência geológicos. Estes desenvolvimentos criaram grande demanda por RMs (certificado) tanto para razão isotópica e medições microanálise. Um desafio para a produção de isótopos de RMs é preparar uma solução de RM com uma composição isotópica semelhante aos sistemas naturais sob investigação. Por exemplo, cádmio e níquel, metais refinados, têm composições isotópicas fracionadas muito acima da faixa observada em sistemas naturais de interesse. Além disso, os autores chamam a atenção que, para estabelecer a rastreabilidade metrológica dos materiais de referência geológicos na ausência de pontos de partida desenvolvidos por instituições nacionais de metrologia, é uma questão importante que precisa de atenção em todas as certificações futuras.

Recentemente foi desenvolvido um trabalho visando a produção de três materiais de referência certificados (WANG et al., 2012) para o teor de água com base em soluções mistas de carbonato de xileno, butanol e propileno. Esses três CRM foram produzidos e certificados pelo método de Karl Fischer coulométrico e por métodos volumétricos.

3.3 - Materiais de Referência no Brasil

O crescimento industrial no século XX fortaleceu a necessidade de criar no Brasil instrumentos mais eficazes de controle que viessem a impulsionar e proteger produtores e consumidores. Em 1961, foi criado o Instituto Nacional de Pesos e Medidas (INPM), centralizando a política metrológica nacional e em 1973, este foi substituído pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), que atua em diversas funções, dentre elas, manter e conservar padrões de medidas, bem como promover e manter a cadeia de rastreabilidade dos padrões das unidades de medida, executar atividades de acreditação de laboratórios de calibração e de ensaio, entre outros (<http://www.inmetro.gov.br>).

Os primeiros passos para a produção de materiais de referência para análise química datam de 1975, com a criação do Núcleo de Padrões Analíticos, atualmente Agrupamento de Materiais de Referência, pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT), com a certificação de ligas metálicas, minérios e óleos minerais (<http://www.ipt.br/solucoes/54.htm>).

Foram produzidos materiais de referência em 1986 para carvão mineral seguido do minério de ouro pelo Centro de Tecnologia Mineral (CETEM) (<http://www.cetem.gov.br/mrc/historico.htm>). A produção de materiais de referência em matrizes biológicas teve início a partir de 1982 pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade na Saúde (INCQS) e pela Fundação Oswaldo Cruz/Ministério da Saúde (<http://www.incqs.fiocruz.br>) para o controle de qualidade de produtos sujeitos à vigilância sanitária.

O Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) em colaboração com a Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA) desenvolveu a partir de 1992, para o setor agropecuário, o material de referência “Trace Elements in Soya Flour” (IAEA RM-361), para Br, Ca, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Rb e Zn em valores de consenso com 21 laboratórios participantes da América Latina (SILVA, 2011).

A base de dados COMAR (Banco Internacional de Dados de Materiais de Referência Certificados) (<http://www.comar.bam.de/en/>), disponibiliza em seu endereço eletrônico todas as informações sobre os materiais de referência produzidos no mundo, registrando mais de 220 produtores e 11300 materiais de referência certificados. Atualmente a COMAR congrega 19 centros de codificação,

situados em países da Europa, América do Norte, América Latina, Ásia e Oceania. Os materiais de referência certificados catalogados devem atender às recomendações dos ISO Guias 31, 34 e 35. Os campos de aplicação definidos para cadastro na COMAR são: ferrosos, não ferrosos, inorgânicos, orgânicos, propriedades físicas, biológicos, qualidade de vida e indústria. A partir desses dados, em todo o mundo existe uma crescente demanda por vários tipos de materiais de referência, o que leva a uma maior oferta e um aumento contínuo do número de produtores de tais materiais (KUPIEC et al., 2009). Matrizes como alimentos, amostras ambientais e biológicas, produtos petroquímicos, amostras geológicas e farmacêuticas são exemplos de matrizes constantemente analisadas e por isso a demanda por materiais de referência desses compostos é grande. Em relação aos analitos mais investigados, destacam-se os compostos orgânicos e inorgânicos.

De uma maneira geral, a produção de materiais de referência certificado no Brasil é recente e está em desenvolvimento. A complexidade do preparo e a caracterização dos CRMs implica em tempo elevado de processamento, resultando em alto preço final. Por outro lado, existe a necessidade premente pelo fornecimento deste tipo de material, considerando o aumento dos laboratórios certificados, as dificuldades e os custos envolvidos para a aquisição dos CRMs. Essas dificuldades envolvem desde os problemas relacionados com as condições de entrega e os prazos de validade quanto às dificuldades e restrições legais para a importação de certos tipos de material, nem sempre sendo possível dispor de um CRM de matriz semelhante à das amostras em estudo ou com níveis de concentrações da mesma ordem de grandeza. Some-se a essas dificuldades a carência de materiais de referência para o setor agropecuário e às diferentes características dos materiais disponíveis em relação às necessidades dos laboratórios. Devido ao crescimento neste setor, o Brasil somente poderá continuar e expandir suas exportações sendo competitivo e adequando o produto nacional às exigências do mercado internacional. E para isso, tem-se a importância da utilização e desenvolvimento de novos materiais de referência e materiais de referência certificados.

Existe uma importante contribuição do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT) para materiais de referência certificados da área siderúrgica (aços, ferros fundidos, metais puros, ligas de cobre, ferro-ligas, refratários e minérios), e para a indústria do petróleo. Alguns trabalhos podem ser

mencionados como um estudo sobre a homogeneidade de um lote de material de silício metálico candidato a material de referência (CHUI et al., 2005) e outro trabalho para a certificação de material de referência de minério de ferro (BISPO, 2006).

Outra contribuição importante para esta área é dada também pelo Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO), que produziu material de referência de etanol em água que pode ser utilizado na calibração de analisadores de álcool para determinação de teor alcoólico expirado por motoristas (SOUZA et al., 2008). Além disso, destacam-se também soluções tampão para pH, de cachaça e solução de HCl. Atualmente se encontra em andamento a certificação de três novos materiais de referência para a indústria farmacêutica, que se destinam a ser utilizados em métodos de ensaio, calibração de equipamento, validação do método, além da atribuição de valores de propriedade rastreáveis e com as correspondentes incertezas (NOGUEIRA et al., 2012).

O Centro de Tecnologia Mineral (CETEM) produziu um CRM de bauxita e dois CRMs para a indústria de cobre (CETEM, 2007a, 2007b, 2007c) e também o Instituto de Geociências da Universidade de Campinas, São Paulo (UNICAMP) certificou um material de referência de basalto (COTTA e ENZWEILER, 2008).

TAGLIAFERRO et al. (2006) avaliaram a qualidade dos grãos de café orgânico para a preparação de um candidato a material de referência. Assim, foi realizada a amostragem dos grãos de café recolhidos durante a preparação do material de referência de café verde orgânico para avaliar a homogeneidade. Os elementos Br, Ca, Co, Cs, Fe, K, Na, Rb, Sc e Zn foram determinados por análise por ativação com nêutrons (INAA), sendo que pelo teste-*F* de Fisher foi demonstrado que o material é homogêneo para o Ca, Co, Cs, K e Sc, porém não homogêneo para Br, Fe, Na, Rb e Zn. Os resultados mostraram que o processo de preparação da amostra foi adequado como etapa inicial para a produção da amostra candidata a material de referência.

CARIONI et al. (2011) avaliaram vários parâmetros para a quantificação de arsênio total em um material candidato a material de referência de atum. As determinações foram feitas por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite com amostragem em suspensão (SLS-GF AAS) e espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos e amostragem de suspensão (SLS-HG AAS). Os principais parâmetros investigados foram: a homogeneidade, a segregação do analito durante a produção e a composição do material. A exatidão

dos procedimentos foi verificada com atum CRM de peixe (BCR 627), com recuperações de 102 e 94% para SLS-GF AAS e SLS-HG AAS, respectivamente. O fator de homogeneidade foi calculado para os procedimentos de pré-tratamento diferentes e para tamanhos de partícula na faixa de 500-150 µg, indicando boa homogeneidade, exceto para o peixe cru.

Foi proposto o preparo de material de referência de mexilhão da espécie *Perna perna* para ser utilizado em estudos de biomonitoramento de elementos tóxicos realizados em pontos do litoral brasileiro. Os resultados preliminares foram obtidos para a concentração de elementos como As, Br, Co, Cr, Fe, K, Na, Se e Zn, determinados por INAA, e Cd e Hg, determinados por espectrometria de absorção atômica (AAS) e foram obtidos valores certificados para As, Ca, Cl, Co, K, Mg, Mn, Na, Se, Th e Zn com incertezas expandidas menores que 20% (MOREIRA et al., 2007). Além disso, foi utilizada a técnica INAA para o estudo de homogeneidade (MOREIRA et al., 2010a), avaliação do estudo de estabilidade de curto prazo (MOREIRA et al., 2009) e o estudo de estabilidade a longo prazo deste material (MOREIRA et al., 2010b).

SILVA (2011) preparou um material candidato a material de referência para mistura mineral para gado de leite. Foram determinados os analitos Ca, K, Na, P, Cu, Fe, Mn, Mg, Zn e os contaminantes As, Cd e Pb. As técnicas de espectrometria de absorção atômica (AAS) e ICP OES foram utilizadas para a determinação de cada um dos analitos, sendo realizados os testes de homogeneidade intra-amstral e inter-amstral e os testes de estabilidade a curto e a longo prazo. Os valores de consenso para cada analito foram obtidos através de um programa interlaboratorial, sendo determinadas todas as incertezas relacionadas.

ULRICH (2011) preparou e caracterizou um material de referência nacional de peixe, possibilitando a certificação desse material na matriz de peixe em mercúrio e metilmercúrio utilizando duas técnicas analíticas, a espectrometria de absorção atômica com sistema de injeção em fluxo e geração de vapor frio (FIA-CV-AAS) e, como método primário, a diluição isotópica aplicada a espectrometria de massa (IDMS).

Recentemente CHELEGÃO (2012) desenvolveu um material de referência de peixe visando à determinação de mercúrio total (THg) e metilmercúrio (MeHg). A escassez de RM para espécies químicas torna necessária a produção de

novos materiais. Assim, este trabalho investigou parâmetros relacionados à produção de um material de tecido de peixe candidato a RM para ser aplicado em determinações de THg e MHg⁺ como a homogeneidade, a massa mínima de amostra, a segregação e o tamanho de partículas. Os principais métodos empregados foram a espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (CV AAS) e a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS). Os valores de THg e MHg⁺ obtidos foram respectivamente $3,03 \pm 0,22 \mu\text{g g}^{-1}$ e $2,51 \pm 0,28 \mu\text{g g}^{-1}$.

Ensaio de proficiência nacionais também são importantes ferramentas para o estabelecimento da rastreabilidade e confiabilidade metrológicas. No Brasil, diversos grupos relacionados à área agropecuária vêm se dedicando em implantar este tipo de estudo, como forma de uniformizar os procedimentos e a qualidade dos laboratórios. Dentre outros, podem ser citados os ensaios de proficiência para laboratórios de nutrição animal (SOUZA et al., 2009); e o ensaio de proficiência para laboratórios de solos pelo método IAC (Instituto Agrônomo de Campinas) (AGBENIN e CANTARELLA, 2011). Os autores avaliaram o desempenho dos laboratórios de solos comerciais em um programa de teste de proficiência no Brasil. Além disso, existem outros programas interlaboratoriais nacionais que podem ser mencionados como os coordenados pela ESALQ (plantas), pela Universidade Federal de Viçosa (solos), Embrapa Solos (solos), entre outros.

3.4 – Forrageira

As forrageiras, na nutrição animal sob sistema de pastejo, se constituem em uma área de extrema importância para a bovinocultura de corte em todo o mundo, e em especial nos países tropicais e subtropicais como o Brasil, que têm como característica e como vantagem econômica a produção de carne bovina fundamentada em pastagens. No entanto, para que os resultados deste tipo de avaliação sejam de utilidade prática e se transformem em incrementos de produtividade e de eficiência bioeconômica do sistema de produção, faz-se necessário que esta seja conduzida considerando-se a existência de dois sistemas bem definidos, os quais seriam pastagem e animal. É importante ainda, além do entendimento dos inter-relacionamentos destes dois sistemas, conhecerem as relações em um ambiente mais amplo que envolve o complexo solo-planta-animal. (EUCLIDES e EUCLIDES FILHO, 1998).

A produção de carne (bovina, suína e aves) deverá aumentar em 12,6 milhões de toneladas até 2018/2019, segundo previsões da Coordenação Geral de Planejamento Estratégico, da Assessoria de Gestão Estratégica (AGE), do Ministério da Agricultura. Isso representa um acréscimo de 51% em relação à produção de carnes de 2008. Neste período, o mercado interno será responsável pelo consumo de 50% da produção. No mercado externo, o Brasil se destaca como o maior exportador de carnes bovinas no mundo e, segundo os dados do Ministério da Agricultura, até 2020, a produção nacional deverá responder por 44,5% do mercado mundial. O melhor uso das pastagens por meio de modernas técnicas agronômicas e nutricionais, aliado aos investimentos em genética, contribui para o crescimento da produção de bovinos e bubalinos, tendo em contrapartida, menor utilização de áreas. Além disso, as novas técnicas reduzem a idade de abate e aumentam a qualidade da carne produzida (<http://www.agricultura.gov.br/animal/exportacao>).

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

Com relação à dieta animal, geralmente os nutrientes são obtidos através de forrageiras, rações concentradas e misturas minerais. Os bovinos necessitam de minerais que são considerados essenciais para a sua saúde e para a manutenção da fertilidade (TOKARNIA et al., 2000; NICODEMO et al., 2008). Dentre esses, tem-se: os macronutrientes: cálcio (Ca), magnésio (Mg), fósforo (P), potássio (K), sódio (Na), cloro (Cl) e enxofre (S), requeridos em quantidades relativamente altas na dieta (determinadas em g.kg^{-1} ou em % de matéria seca) e os micronutrientes: cromo (Cr), cobalto (Co), cobre (Cu) iodo (I), manganês (Mn), molibdênio (Mo), níquel (Ni), selênio (Se) e zinco (Zn), cujas exigências diárias são geralmente da ordem de miligramas para uma ou mais espécies de animais.

A análise química de forrageiras é uma das ferramentas utilizadas na formulação de suplementos minerais. Essa informação, por si só, não é suficiente para saber se um determinado mineral está ou não adequado na dieta, pois inúmeras interações de nutrientes e associações na planta podem influenciar a sua disponibilidade para o animal (NICODEMO et al., 2008).

Alguns problemas com a dieta do animal são originados devido a não observância da espécie, idade, sexo e produção (ANDRIGUETTO, 1985).

A Tabela 3.4.1 mostra alguns dos macro e micronutrientes presentes na alimentação, sua função no organismo animal e sua deficiência no animal.

A *Brachiaria brizantha* cv. Marandu é uma forrageira bem adaptada a solos de baixa fertilidade, responde bem à adubação e apresenta bom valor nutritivo e é uma das mais utilizadas na pastagem nacional (MONTEIRO et al., 1995). O valor nutritivo refere-se à composição química da forragem e sua digestibilidade e, em relação a qualidade de uma planta forrageira, esta é representada pela associação da composição bromatológica, da digestibilidade, dos componentes inorgânicos e do consumo voluntário da forragem em questão (GERDES et al., 2000).

TABELA 3.4.1 – Função de macro e micronutrientes presentes no organismo animal e as causas de suas possíveis deficiências.

Elementos	Característica Nutricional	Deficiência no animal
P	☺ Reprodução e metabolismo celular	☹ Problemas com fertilidade e crescimento
K	☺ Síntese de proteína	☹ Esterilidade e crescimento
Ca	☺ Formação do tecido ósseo	☹ Osteoporose
Mg	☺ Função das células nervosas e musculares	☹ Queda na produção de leite, tremores musculares e convulsões
Fe	☺ Constituição da hemoglobina	☹ Anemia
Cu	☺ Composição de enzimas com funções oxidativas	☹ Fibrose do miocárdio, distúrbios ósseos
Zn	☺ Síntese protéica	☹ Queda na produção de leite e da fertilidade
Mn	☺ Metabolismo de aminoácidos	☹ Redução de crescimento e fertilidade
Na	☺ Pressão osmótica	☹ Problemas saúde e produtividade animal

Uma das grandes preocupações em relação à qualidade do alimento tanto animal quanto humano é a presença de elementos tóxicos. Há diferentes fontes de contaminantes no ambiente como as fontes naturais ou agrícolas, tais como fertilizantes orgânicos e inorgânicos e pesticidas, resíduos industriais, efluentes domésticos, ou fontes atmosféricas, entre outros (NAGAJYOTI et al., 2010; RAIJ, 2011; MALAVOLTA, 1994; ELPO e FREITAS, 1995; SENESI et al., 1999).

A ingestão de contaminantes pode resultar em efeitos tóxicos e provocar o desenvolvimento de doenças crônicas e agudas nos animais e seres humanos (ATSDR, 2013), conforme apresentado na Tabela 3.4.2. Quando esses elementos são absorvidos pelas plantas, pode haver perdas no desenvolvimento ou mesmo destruição total da cultura. Existe, ainda, a possibilidade de o elemento tóxico ser lixiviado para o lençol freático, dependendo do elemento em questão, da sua forma química e da quantidade em que esse foi introduzido no sistema, assim como das reações que esse sofrerá após sua adição ao solo e das condições adversas que acabem por causar sua mobilização (SPADOTTO e RIBEIRO, 2006; MALAVOLTA, 1994).

Assim, a avaliação dos teores de contaminantes presentes em solos e plantas apresenta-se relevante, pois permite verificar se existe algum risco de incorporação desses elementos potencialmente tóxicos na cadeia alimentar.

Na Tabela 3.4.2 são apresentadas as principais funções e causas de alguns contaminantes, em especial o Cd, Cr, Pb e As, caso estes elementos forem ingeridos pelo animal (ANDRIGUETTO, 1985).

TABELA 3.4.2 - Principais funções e causas dos contaminantes em animais

Elementos	Característica Nutricional	Funções
Cr	Cr (III) essencial, necessidade 0,1 ppm.	☹ Cr (VI) – carcinogênico
As	Tóxico	☹ Ação inibidora sobre o sistema redox. Acumula-se no fígado
Pb	Tóxico	☹ Fixa-se no esqueleto. Intoxicação crônica.
Cd	Tóxico	☹ Disfunção renal, tumor e necrose dos testículos.

Assim, a avaliação dos teores de contaminantes presentes em solos e plantas apresenta-se relevante, pois permite verificar se existe alguma fitotoxicidade da planta neste ambiente, se esta pode ser considerada como fitorremediadora, ou seja, dependendo da capacidade de absorção da planta, diminui o teor de contaminantes no solo e se existe algum risco de incorporação desses elementos potencialmente tóxicos na cadeia alimentar (CARVALHO et al., 2008; MELO et al., 2009, MARSOLA et al., 2005).

A determinação correta dos teores desses contaminantes em amostras de plantas e solos é importante e, para isso, a disponibilização de amostras de referência é essencial, pois permite o controle e a validação dos resultados obtidos.

A obtenção de material vegetal com contaminantes inorgânicos em seus tecidos, visando à produção de amostras de referência possibilita o controle de qualidade de laboratórios e a validação de métodos analíticos. Assim, existe a necessidade de estudos sobre a produção de materiais vegetais obtidos de cultivos em ambiente controlado com contaminantes inorgânicos.

Capítulo 4

Materiais e Métodos

4 – Materiais e Métodos

4.1 – Instrumentação

Para secagem das amostras foi utilizada estufa com circulação forçada de ar (Fanem, Brasil).

Foram utilizados moinhos de facas em aço inoxidável de bancada (tipo Wiley) com peneira de 500 μm (Manesco & Ranieri LTDA, Modelo 093/77, Piracicaba, SP) e moinho ultracentrífugo com peneira de 250 μm (Retch, Alemanha).

Para o envase do material candidato a material de referência foi realizada anteriormente a homogeneização, sendo utilizado um homogeneizador do tipo Y da marca Marconi, Piracicaba, SP, Brasil.

Para o preparo das amostras da parte aérea da forrageira, caule, raiz e solo dos estudos dos 16 vasos foi utilizado um forno com radiação micro-ondas com cavidade (Ethos 1, Millestone, Itália) contendo rotor com 10 frascos de TFM ®.

No preparo de amostras de forrageira candidata a material de referência para determinação dos teores totais foi utilizado um forno com radiação micro-ondas com cavidade (Ethos 1, Millestone, Itália) que contém o rotor com 41 frascos de TFM ®.

Para pesagem das amostras estudadas foi utilizada uma balança analítica (Mettler AE200, Zurique, Suíça).

A digestão do candidato a material de referência também foi feita em bloco digestor da marca Tecnal, modelo 40/25

Os experimentos para os teores totais dos macro e micronutrientes foram realizados usando a determinação simultânea de diversos minerais por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES) com visão radial (Varian, Vista RL, Mulgrave, Austrália).

Os experimentos para os teores totais dos contaminantes foram efetuados usando a determinação simultânea de diversos minerais por espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) (CRI, Varian 820-MS, Melbourne, Austrália), que apresenta uma Interface de Reação e Colisão (CRI), possibilitando a injeção de gases hélio ou hidrogênio para diminuir possíveis interferências poliatômicas.

Para a determinação dos elementos em Análise por Ativação Neutrônica Instrumental (INAA), realizada no Centro de Energia Nuclear da

Agricultura (CENA) na Universidade de São Paulo, Piracicaba foram utilizadas cápsulas de polietileno (Vrije Universiteit, Amsterdã, Holanda) juntamente com fios de Ni-Cr de composição conhecida para determinação dos fluxos de nêutrons. A irradiação foi feita com fluxo de nêutrons de $10^{13} \text{ cm}^{-2}\text{s}^{-1}$ por 8 horas no reator de pesquisa nuclear IEA-R1 do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN), São Paulo. Depois do tempo de decaimento de 3, 6, 12 e 30 dias, as irradiações induzidas foram medidas em detectores HPGe (germânio de alta pureza) (modelos GEM45190 e GMX50220, Ortec). A quantificação dos elementos foi feita pelo método k_0 usando o software Quantu MCA para interpretação dos espectros e Quantu INAA para os cálculos das frações de massa.

A determinação da distribuição do tamanho de partículas também foi realizada no Centro de Energia Nuclear da Agricultura (CENA) na Universidade de São Paulo, Piracicaba da marca Analysette 22 MicroTec Plus, da Fritsch, Alemanha, usando a dispersão seca.

4.2 – Reagentes e Soluções

Reagentes de grau analítico e água deionizada a 18 M Ω cm em sistema Milli-Q[®] (Millipore) foram empregados para preparo das soluções, tais como ácido nítrico (Aldrich Chemical, Milwaukee, WI, USA) e peróxido de hidrogênio (Aldrich Chemical, Milwaukee, WI, USA), usados para as digestões das amostras.

Para a mineralização em bloco digestor, além do ácido nítrico, foi usado o ácido perclórico (Impex, Brasil).

As soluções estoque de todos os elementos foram preparadas a partir da diluição de solução padrão comercial 1000 mg L⁻¹ (Quemis high purity, USA).

Em todos os procedimentos de digestão foram utilizados ácido nítrico que foi purificado por destilação abaixo do ponto de ebulição utilizando um destilador de quartzo (Marconi, Piracicaba, SP, Brasil).

4.3 – Descontaminação dos materiais

Todos os materiais utilizados no trabalho foram previamente lavados com detergente neutro e água corrente, abundantemente enxaguados com água destilada e deixados em banho de HNO₃ 10 % (v/v) por no mínimo 24 h. A seguir, os

materiais foram enxaguados com água deionizada e levados para secar em uma capela de fluxo laminar.

Frascos vidro âmbar (boca larga) de 150 mL com tampa plástica rosca e disco de plexan interno (Samavidros, São Paulo, SP) e frascos de plástico (Injeplast, São Paulo, SP) foram adquiridos, lavados e descontaminados com HNO₃ 10% (v/v) e secagem em capela de fluxo laminar para posterior envase do candidato a material de referência pronto.

4.4 – Amostras e materiais de referência certificados

A espécie estudada foi plantada em casa de vegetação na Embrapa Pecuária Sudeste em São Carlos – SP. O capim-Marandu (*Brachiaria brizantha* Stapf cv. Marandu) foi semeado em 400 vasos com 25 kg de terra. Foi utilizado um tipo de solo argissolo vermelho amarelo distrófico, textura média.

Para verificar a exatidão do método proposto para determinação dos teores totais, os analitos foram determinados em materiais de referência certificados de folhas de tomateiro (NIST 1573a) e folhas de pessegueiro (NIST 1547) produzidos pelo National Institute of Science and Technology (NIST, Gaithersburg, MD, EUA).

Capítulo 5

Procedimento Experimental

5 – Procedimento Experimental

5.1 – Montagem do experimento em casa de vegetação

Após a coleta do solo, este foi empregado para o preenchimento dos vasos onde foi realizado o plantio. Uma porção amostrada deste solo foi separada para a execução de análises químicas e físicas no laboratório de solos da Embrapa Pecuária Sudeste (Tabela 5.1.1). Paralelamente foram preenchidos 400 vasos de 25 kg, localizados em casa de vegetação (Figura 5.1.1).

TABELA 5.1.1 – Resultados da análise do solo para fins de fertilidade.

K	Ca	Mg	H+Al	Al	CTC	S	V	S-SO₄
mmol _c dm ⁻³							%	mg dm ⁻³
0,6	4	1	31	3	37	6	15	2

As características químicas do solo, na camada de 0 a 20 cm, antes do início do experimento, foram: pH_{CaCl2} = 4,5; M.O. = 18 g dm⁻³; Presina = 3 mg dm⁻³; K = 0,7 mmol_c dm⁻³; Ca = 11 mmol_c dm⁻³; Mg = 4 mmol_c dm⁻³; H+Al = 39 mmol_c dm⁻³; Al³⁺ = 4 mmol_c dm⁻³; CTC = 55 mmol_c dm⁻³; V = 29%; B = 0,16 mg dm⁻³; Cu = 0,6 mg dm⁻³; Fe = 15 mg dm⁻³; Mn = 2,5 mg dm⁻³; Zn = 0,3 mg dm⁻³. E as características físicas foram: areia = 637 g kg⁻¹; argila = 312 g kg⁻¹; e silte = 51 g kg⁻¹.

Em seguida, foi realizada a correção com calcário dolomítico (20g/vaso – 1,43 t/ha) escolhendo uma saturação por base (V) de 50%, proporcionando a pouca elevação do pH do solo, que melhora a mobilidade e a absorção pela planta dos contaminantes que foram adicionados. Em seguida, foi realizado o plantio da forrageira selecionada. Na Figura 5.1.1 são mostrados os vasos após o plantio e na Figura 5.1.2 estão as sementes de *Brachiaria brizantha* Stapf. cv. Marandu utilizadas para plantio. Deve ser observado que, para evitar contaminação externa, os vasos foram colocados acima de lona plástica para isolamento.



FIGURA 5.1.1 - Vasos plantados com forrageira *Brachiaria brizantha* Stapf. cv. Marandu, instalados em casa de vegetação.



FIGURA 5.1.2 - Exemplo de vaso com a semente de *Brachiaria brizantha* Stapf. cv. Marandu.

Após o plantio, foi transferido 5 mudas por vaso e adubação com KCl e superfosfato simples, esperou-se cerca de 2 meses para a realização do primeiro corte geral dos 400 vasos (Figura 5.1.3). Todos os cortes da parte aérea foram realizados a 20 cm do solo, pois essa é altura mínima de pastejo, e após finalização de cada corte foi realizada a nova adubação com 2,20 g em cada vaso do fertilizante N, P e K.



(a)



(b)

FIGURA 5.1.3. (a) *Brachiaria brizantha* Stapf. cv. Marandu após 2 meses e (b) realização do primeiro corte.

5.2 – Avaliação de diferentes doses dos contaminantes (As, Pb, Cd e Cr)

Após este primeiro corte de todos os 400 vasos, foi então realizado um estudo de adições crescentes dos contaminantes As, Cd, Cr e Pb, com 4 repetições para cada concentração, incluindo a testemunha. A finalidade desse estudo foi o estabelecimento de uma dosagem adequada, que não prejudicasse de forma crítica a produção de matéria seca e que também fosse possível de se determinar os elementos adicionados. A seguir encontra-se uma tabela das concentrações adicionadas com suas respectivas massas em gramas dos contaminantes colocadas em cada vaso. (Tabela 5.2.1).

TABELA 5.2.1 - Concentrações dos contaminantes estudadas nos 16 vasos.

Tratamentos (mmol por vaso)	Contaminantes (g por vaso)			
	Pb	Cd	As	Cr
0	0	0	0	0
12,5	2,59	1,4	0,94	0,65
25	5,18	2,8	1,87	1,30
50	10,6	5,6	3,74	2,60

Os sais utilizados foram $Pb(NO_3)_2$, $Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$ e $Cr(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$. Todos os sais foram adicionados juntos em solução aquosa e

durante dois dias 500 mL dessa solução dos sais, ou seja, 250 mL cada dia por vaso. Após a adição desses contaminantes esperou-se aproximadamente 60 dias e realizou-se o primeiro corte da parte aérea dos 16 vasos. Foram realizados no total seis cortes da parte aérea, todos com intervalo de 60 dias para cada corte. Deve-se destacar que a cada corte feito dos 16 vasos, também foi feito o corte da parte aérea da forrageira dos vasos restantes seguida de adubação na dose equivalente a 250 kg ha⁻¹ com N-P-K na formulação 20-05-20.

Depois do sexto corte da parte aérea, foi realizada a abertura dos 16 vasos e retirados o caule (região abaixo dos 20 cm do corte), a raiz e o solo de cada vaso. Os seis cortes da parte aérea, caule e a raiz foram secos em estufa com circulação forçada de ar em temperatura (Fanem, Brasil) a 45 °C por 72 horas e moagem em moinho de facas em aço inoxidável de bancadas (tipo Wiley) com peneira de 500 µm (Manesco & Ranieri LTDA, Modelo 093/77, Piracicaba,SP). O solo foi seco ao ar e peneirado em peneira de 250 µm.

As digestões das amostras dos seis cortes da parte aérea, caule, raiz e solo foram realizadas empregando forno com radiação micro-ondas com cavidade utilizando rotor de 10 frascos de TFM®.

Para a digestão das amostras da parte aérea, caule e raiz foram utilizados 250 mg de amostra ou material de referência certificado de folhas de tomateiro (NIST 1573a) e folhas de pessegueiro (NIST 1547), 2,0 mL de H₂O₂ (30% m/m), 1,5 mL de HNO₃ (65% v/v) e 4,5 mL de H₂O deionizada. Após a digestão, as amostras foram diluídas para 15 mL com água deionizada. O programa de aquecimento utilizado no forno de micro-ondas com cavidade é apresentado na Tabela 5.2.2.

TABELA 5.2.2 - Programa de aquecimento empregado na digestão ácida assistida por radiação micro-ondas.

Tempo (min)	Potência (W)	Temperatura (°C)
12	900	120
6	1100	180
10	1100	180

Para a extração dos elementos de interesse (digestão parcial) das amostras de solo foram utilizados 250 mg de amostra, 6,0 mL de água-régia, deixando reagir com a amostra por 15 minutos e, em seguida, 2,0 mL de H₂O₂ (30% m/m). Após a digestão, as amostras foram diluídas para 20 mL com água deionizada. Na Tabela 5.2.3 é apresentado o programa de aquecimento utilizado no forno de micro-ondas com cavidade.

TABELA 5.2.3 - Programa de aquecimento empregado na digestão ácida assistida por radiação micro-ondas para amostras de solo.

Tempo (min)	Potência (W)	Temperatura (°C)
12	1100	120
10	1100	180
15	1100	200

Para as amostras digeridas dos seis cortes da parte aérea e o caule, as determinações de arsênio, cádmio, chumbo e cromo foram realizadas por espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) e os parâmetros empregados na determinação estão apresentados na Tabela 5.2.4.

Assim, para as determinações nessa técnica, teve-se a necessidade de se fazer a otimização das melhores condições para a determinação dos isótopos ⁷⁵As⁺, ¹¹²Cd⁺, ¹¹⁴Cd⁺, ⁵²Cr⁺, ⁵³Cr⁺, ²⁰⁶Pb⁺, ²⁰⁷Pb⁺ e ²⁰⁸Pb⁺. Através das melhores recuperações dos materiais de referência certificados pôde-se, então, escolher as melhores condições e assim, as quantificações dos elementos de interesse.

As condições estudadas para o ICP-MS foram: Modo padrão (sem CRI) com e sem adição dos padrões internos de ⁸⁹Y⁺, ⁴⁵Sc⁺, ²⁰⁹Bi⁺ e ¹⁰³Rh⁺ na concentração de 5 µg L⁻¹ nos digeridos e na curva analítica, com a CRI (60 mL min⁻¹ de H₂) utilizando ou não os padrões internos ⁸⁹Y⁺, ⁴⁵Sc⁺, ²⁰⁹Bi⁺ e ¹⁰³Rh⁺ e com a CRI (80 mL min⁻¹ H₂) com e sem ⁸⁹Y⁺, ⁴⁵Sc⁺, ²⁰⁹Bi⁺ e ¹⁰³Rh⁺. Os padrões internos geralmente são utilizados para corrigir possíveis efeitos de transporte dos analitos para posterior detecção.

TABELA 5.2.4 - Parâmetros empregados na análise por ICP-MS

Características	Parâmetros
Gerador de frequência	27 MHz
Potência de radio-frequência	1,4 kW
Vazão do gás do plasma	18 L min ⁻¹
Vazão do gás auxiliar	1,8 L min ⁻¹
Vazão do gás de nebulização	0,93 L min ⁻¹
Vazão do “ <i>sheath gas</i> ”	0,19 L min ⁻¹
Nebulizador	Seaspray
Câmara de nebulização	Scott
Temperatura da câmara de nebulização	2°C
Processamento do sinal	“ <i>Peak Hopping</i> ”
Isótopos monitorados	⁷⁵ As ⁺ , ¹¹² Cd ⁺ , ¹¹⁴ Cd ⁺ , ⁵² Cr ⁺ , ⁵³ Cr ⁺ , ²⁰⁸ Pb ⁺ , ²⁰⁶ Pb ⁺ , ²⁰⁷ Pb ⁺

Para as amostras digeridas de raiz e solo, as determinações de arsênio, cádmio, chumbo e cromo foram realizadas por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES) e os parâmetros empregados na análise estão na Tabela 5.2.5.

TABELA 5.2.5 - Parâmetros empregados na análise por ICP OES radial

Características	Parâmetros
Potência de radio frequência	1,0 KW
Vazão do nebulizador	0,75 L.min ⁻¹
Vazão do gás do plasma	15 L.min ⁻¹
Vazão do gás auxiliar	1,5 L.min ⁻¹
Nebulizador	V-Groove
Câmara de Nebulização	Sturman-Masters
Comprimento de onda (nm)	As - 193,696
	Cd – 226,506
	Cr – 267,716
	Pb – 220, 353

5.3 – Preparo do material candidato a material de referência

A adição de contaminantes na quantidade definida no estudo prévio foi feita nos 375 vasos já previamente preparados. Foi empregado 25 mmol/vaso, a dose escolhida no estudo prévio, sendo adicionados 500 mL de solução aquosa dos sais dos contaminantes estudados, em época de estação de verão, pois nesta estação a forrageira pode ter maior absorção desses elementos. Depois de aproximadamente 60 dias foi feito o primeiro corte da parte aérea e após 120 dias, o segundo corte da parte aérea para obtenção do material. Foi feita a secagem em estufa com circulação forçada de ar a 45 °C, moagem em moinho de facas com peneira de 500 µm e para diminuir o tamanho de partícula foi utilizado o moinho ultracentrífugo (Retch, Alemanha) utilizando uma peneira de 250 µm, obtendo-se aproximadamente 20 kg de material seco e moído somente da parte aérea da forrageira em estudo. Esse processo demandou um longo tempo, de forma a evitar o aquecimento dos moinhos, para se evitar o aquecimento da amostra e consequente perda de elementos voláteis.

Após essa etapa foi realizada a homogeneização do material, separado em três recipientes plásticos e homogeneizado em um homogeneizador tipo Y (Marconi, Piracicaba, SP, Brasil). Para compor uma amostra a ser homogeneizada, foram utilizados aproximadamente 6 kg de amostra em cada um desses recipientes. Uma porção de cada amostra de cada recipiente foi colocada no homogeneizador, foi realizada a mistura por 20 minutos e esse material homogeneizado foi separado e assim sucessivamente até a finalização da amostra em cada recipiente. Este procedimento foi repetido até que todo o material fosse homogeneizado. Assim, todo o processo de separar em recipientes e homogeneizar no homogeneizador em Y foi repetido mais três vezes.

Em seguida foi realizado o envase do material, utilizando 360 frascos de vidro âmbar contendo 50 g de amostra para cada frasco, destinados aos testes de homogeneidade, estabilidade e umidade e também 100 frascos de plástico contendo 20 g cada frasco, destinados ao ensaio de proficiência. Foi realizada a irradiação com raios gama (Co^{60}) (5 a 10 kGy) no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) para esterilização do material, visando o aumento do seu tempo de prateleira.

5.3.1 - Estudo da distribuição do tamanho de partícula

Foram realizadas três leituras em cada um dos três frascos submetidos a um ensaio de distribuição de partícula, conduzido no CENA USP/Piracicaba (Analysette 22 MicroTec Plus, da Fritsch, Alemanha). Foi usada dispersão seca (dry dispersion).

5.4 - Preparo de amostra para o bloco digestor e micro-ondas em determinação por ICP OES

Um dos métodos de decomposição de amostras orgânicas e biológicas mais utilizado é a decomposição por via úmida. Este método implica no aquecimento da amostra na presença de um ácido mineral oxidante concentrado, de mistura de ácidos oxidantes ou mistura de um ácido oxidante com peróxido de hidrogênio. Após aquecimento, as amostras são oxidadas deixando os elementos a serem determinados na solução ácida em formas inorgânicas simples e apropriados para

análise, se os ácidos forem suficientemente oxidantes, e se o aquecimento for feito a temperaturas elevadas durante um período de tempo adequado (KRUG, 2008).

Considerando que alguns analitos a serem determinados no material são elementos voláteis, a digestão em sistema fechado se mostra mais adequada se comparada com a digestão em sistema aberto, por minimizar perdas por volatilização.

O intuito deste estudo foi somente avaliar o comportamento da digestão do material candidato a material de referência em situações onde não esteja disponível um sistema de digestão assistida por radiação micro-ondas para Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn. Para comparação, foi estudado um procedimento de digestão do material candidato em um bloco digestor (Tecnal modelo 40/25) e outro procedimento empregando forno com radiação micro-ondas com cavidade contendo rotor com 41 frascos de TFM®.

Todos os procedimentos de digestão testados foram realizados com a amostra candidata a material de referência em triplicata.

Na digestão em bloco digestor foram utilizadas 250 mg de amostra e 6,0 mL de solução nítrico-perclórica (4:1) com pré-digestão a temperatura ambiente por 4h (ou por uma noite). Depois se aqueceu gradativamente até 120 °C, e manteve-se essa temperatura até cessar totalmente o desprendimento de NO₂. Em seguida, aumentou-se lentamente a 210 °C, temperatura que foi mantida até a obtenção de fumos brancos de HClO₄.H₂O e que o extrato se apresentasse incolor (NOGUEIRA & SOUZA, 2005). Após a digestão, as amostras foram diluídas para 25 mL com água deionizada.

Para a digestão das amostras em micro-ondas em sistema fechado em rotor de 41 frascos, foram utilizados 200 mg de amostra com a adição de 2,0 mL de HNO₃, 2,0 mL de H₂O₂ e 6,0 mL de H₂O deionizada para que se atingisse o volume mínimo do frasco. Após a digestão, as amostras foram diluídas para 15 mL com água deionizada. Na Tabela 5.4.1 é apresentado o programa de aquecimento utilizado no forno de micro-ondas com cavidade e os parâmetros empregados na análise por ICP OES para a determinação de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn.

TABELA 5.4.1 - Programa de aquecimento empregado na digestão ácida assistida por radiação micro-ondas.

Tempo (min)	Potência (W)	Temperatura (°C)
15	1300	120
35	1500	180
20	1500	180

TABELA 5.4.2 - Parâmetros empregados na análise por ICP OES

Parâmetros Instrumentais	ICP OES (visão radial)
Potência de radio frequência	1,0 KW
Vazão do nebulizador	0,75 L.min ⁻¹
Vazão do gás do plasma	15 L.min ⁻¹
Vazão do gás auxiliar	1,5 L.min ⁻¹
Nebulizador	V-Groove
Câmara de Nebulização	Sturman-Masters
Comprimento de onda (nm)	P – 213,618
	Ca – 422,673
	Mg – 279,553
	Mn – 257,610
	Zn – 213,857
	Cu – 327,395
	Na – 588,995
	K – 766,491
	Fe – 238,204

5.5 - Estimativa da massa mínima da amostra candidata a material de referência

Segundo a ISO GUIA 34, é importante que se estabeleça a massa mínima de amostra para a utilização do candidato a material de referência (ABNT ISO/GUIA 34, 2004). Neste caso, ao se utilizar massas diferentes de amostra, pode-se determinar a massa mínima de amostra necessária para determinada aplicação. Assim, foi realizado um estudo de massa mínima, escolhendo aleatoriamente 1 frasco (frasco nº 140), para As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Pb e Zn em estudo neste trabalho, utilizando-se massas de 100 mg, 150 mg e 200 mg, em triplicata para cada massa com a adição de 2,0 mL de HNO₃, 2,0 mL de H₂O₂ e 6,0 mL de H₂O deionizada. Após a digestão, as amostras foram diluídas para 15 mL com água deionizada. O programa de aquecimento utilizado no forno de micro-ondas com cavidade está indicado na Tabela 5.4.1 e os parâmetros empregados para determinações de arsênio, cádmio, chumbo e cromo realizadas por ICP-MS estão apresentados na Tabela 5.2.4; os parâmetros empregados para ICP OES para a determinação Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn estão na Tabela 5.4.2.

Utilizou-se os dados do teste de análise de variância ANOVA para se avaliar a repetitividade do método e se existe diferenças significativas entre os resultados obtidos das diferentes massas estudadas.

5.6 - Avaliação da homogeneidade dentro e entre frascos

Dentre as etapas de preparo de um material de referência, a homogeneização é uma das mais críticas e pode-se dizer que a boa homogeneidade é pré-requisito para um material de referência. De acordo com o ISO GUIA 30 (ABNT ISO/GUIA 30, 2000), um material de referência é uma *“substância na qual uma ou mais de suas propriedades apresentam valores suficientemente homogêneos e bem estabelecidos de modo que podem ser utilizados na calibração de instrumentos e na avaliação da exatidão do método proposto”*. Assim, deve-se dar importância para a homogeneidade aparente, ou seja, a mesma composição elementar média para amostras a uma certa massa.

Foram determinados para avaliação da homogeneidade “entre os frascos” (*between-bottle*), sendo separados de forma aleatória 10 frascos (frascos nº

65, 32, 190, 359, 30, 325, 110, 22, 51, 187) e analisadas cada um dos frascos em duplicata. Para avaliação da homogeneidade “dentro do frasco” (*in-bottle*), foi separado de forma aleatória 1 frasco (frasco nº 140) e analisadas 10 porções do mesmo para determinação de As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Pb e Zn.

Utilizaram-se massas de amostra de aproximadamente 200 mg, com a adição de 2,0 mL de HNO₃, 2,0 mL de H₂O₂ e 6,0 mL de H₂O deionizada. Após a digestão, as amostras foram diluídas para 15 mL com água deionizada. O programa de aquecimento utilizado no forno de micro-ondas com cavidade está indicado na Tabela 5.4.1 e os parâmetros empregados para determinações dos contaminantes por ICP-MS estão apresentados na Tabela 5.2.4 e os parâmetros empregados para o ICP OES para a determinação dos macro e micronutrientes estão na Tabela 5.4.2.

Utilizou-se o tratamento estatístico de Análise de Variância ANOVA para determinar a variabilidade dos resultados obtidos tanto entre frascos como dentro do frasco.

5.6.1 - Avaliação da homogeneidade entre frascos através da análise por ativação neutrônica instrumental (INAA)

A análise por ativação neutrônica instrumental (INAA) constitui-se numa técnica de alto nível metrológico com exatidão na determinação de elementos químicos em diversos tipos de amostras, favorecendo a comparabilidade de resultados. Além disso, dispensa o trabalho de preparo de amostras, responsável por grande parte da incerteza analítica. As características metrológicas dessa técnica conferem-lhe elevado potencial para ser utilizada como método primário. A NAA pode ser conduzida pelo método paramétrico, em que as concentrações dos elementos são obtidas por uso da equação de ativação, ou pelo método comparativo, mais freqüentemente utilizado, onde são empregados padrões de trabalho de elementos de alta pureza, derivados de padrões primários. (TAGLIAFERRO, 2003). As características metrológicas da NAA conferem-lhe elevado potencial para ser utilizada como método primário direto, onde o valor desconhecido pode ser obtido sem necessidade de referência a um padrão, como em coulometria e gravimetria; e o método primário por razão, onde o valor desconhecido é obtido a partir da razão com um padrão conhecido, como em

espectrometria de massas com diluição isotópica (ICP-MS) (BODE et al., 2000; TAGLIAFERRO, 2003).

Análises nessa técnica foram realizadas no Laboratório de Radioisótopos do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (LRi/CENA/USP). Foram sorteados 10 frascos aleatoriamente e retiradas de três porções analíticas de 200 mg de cada frasco, que foram transferidas para cápsulas de polietileno especial de alta pureza (Vrije Universiteit, Amsterdã, Holanda), específicas para INAA. Fragmentos de 10 mg de liga de Ni-Cr com concentração conhecida de elementos e homogeneidade comprovada foram intercalados entre as cápsulas para a monitorização do fluxo de nêutrons térmicos incidente durante a irradiação (FRANÇA et al., 2003). Em cada série, cápsulas vazias foram irradiadas de modo a detectar elementos químicos interferentes.

As irradiações sob um fluxo de nêutrons foram realizadas no reator nuclear de pesquisa do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), em São Paulo, com duração de 8 horas. A radioatividade induzida foi detectada no LRi/CENA/USP por espectrometria gama de alta resolução, utilizando detectores de germânio hiperpuro. Para melhor detecção de radionuclídeos com diferentes meias-vidas, foram realizadas quatro medições para cada amostra, com tempos de decaimento aproximados de 3, 6, 12 e 30 dias, segundo o protocolo estabelecido no LRi. As amostras foram divididas em lotes, para otimização do tempo de contagem nos detectores. As duas primeiras detecções foram realizadas durante 15 e 30 min cada amostra, respectivamente, e as demais durante 1 h e 2 h por amostra, respectivamente.

Após análise dos espectros de radiação gama, as concentrações dos elementos foram calculadas pelo método paramétrico k_0 conforme (BACCHI et al., 2000). A avaliação dos espectros e todos os cálculos das concentrações foram realizados pelo programa Quantu INAA (BACCHI & FERNANDES, 2003). Os materiais de referência certificados IAEA-V10 (Hay Power) e BCR 482 foram analisados juntamente com as amostras para controle de qualidade analítico (ELIAS, 2008; TAGLIAFERRO, 2003; FERRARI, 2008)

O tratamento estatístico de Análise de Variância ANOVA foi usado para determinar a variabilidade dos resultados obtidos entre os frascos.

5.7 - Estudo de estabilidade do candidato a material de referência

Dependendo do tipo de amostra, esta pode estar exposta a degradação ou perda de analitos ao longo do tempo. Assim, o produtor do material candidato a material de referência deve informar as melhores condições de armazenamento e garantir a estabilidade do material durante o tempo de validade. Os testes de estabilidade só podem ser realizados após ter sido demonstrado homogeneidade suficiente, dessa forma a amostra pode ser considerada representativa (ABNT ISO/GUIA 34, 2004).

Foi realizado também o tratamento estatístico de Análise de Variância ANOVA para determinar a variabilidade dos resultados obtidos em todos os testes de estabilidade.

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

5.7.1 - Estudo de estabilidade a curto prazo

Para o estudo da estabilidade a curto prazo deve-se verificar se existe alguma alteração nas características do material sob condições de armazenamento que não sejam as ideais, por exemplo, uma situação de transporte. Este teste pode ser conduzido por até quatro semanas em temperaturas que podem variar de 70°C a -50°C (ABNT ISO/GUIDE 35, 2006).

Para este estudo, 3 frascos (frascos nº 29, 90, 330) do material candidato foram sorteados aleatoriamente e colocados dentro de um sistema constituído de um frasco grande de vidro no qual a temperatura foi fixada em 38°C na estufa e a umidade em 100% devido a água presente abaixo do suporte que sustenta os três frascos de vidro âmbar, simulando épocas de chuva e calor. Este sistema foi fechado e mantido durante 1 mês e, diariamente era feita a verificação da temperatura e da umidade. Após o período de um mês, foi feita a quantificação em triplicata dos analitos de interesse nos frascos sorteados (SILVA, 2011).

O procedimento indicado na Figura 5.7.1.1 mostra que dentro do sistema adicionou-se água abaixo do suporte em que foram colocados os frascos. Em seguida este sistema foi vedado e colocado em estufa a 38 °C durante 1 mês. O preparo da amostra, as determinações e as condições dos equipamentos utilizados

para análise foram os mesmos utilizados no estudo de homogeneidade entre e dentro dos frascos.

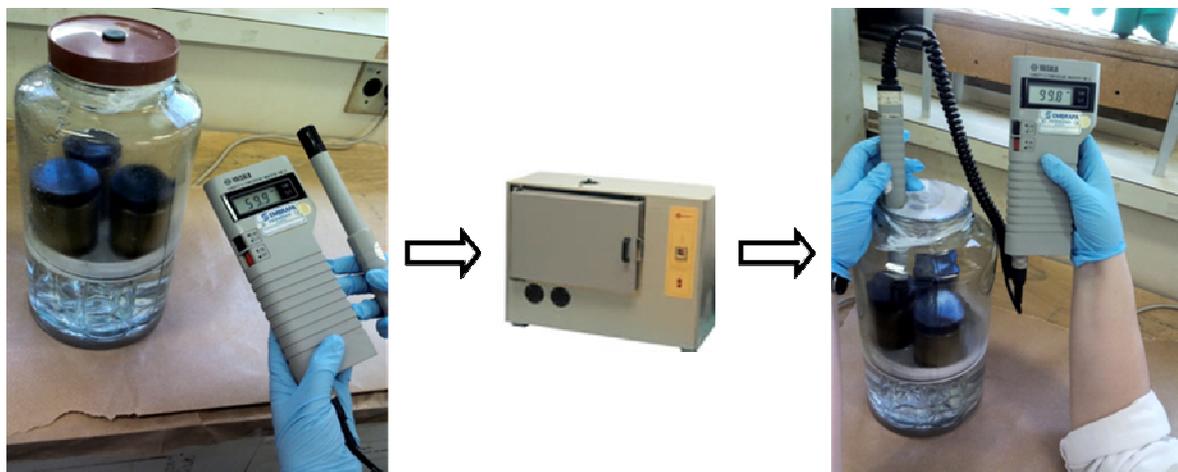


FIGURA 5.7.1.1 - Procedimento utilizado para a realização de teste de estabilidade a curto prazo.

5.7.2 - Estudo de estabilidade a longo prazo

Através deste estudo pode-se determinar o chamado “tempo de prateleira”, ou seja, qual o período para o qual os valores certificados estão garantidos (ISO 35, 2006).

Para realizar este teste, 3 frascos (nº 61, 81, 357) foram sorteados aleatoriamente e a cada 3 meses foi feita uma quantificação dos analitos em estudo, em triplicata, durante o período de 9 meses a temperatura ambiente (cerca de 25 °C), sendo realizado a fim de acompanhar a estabilidade do material sob condições de armazenamento (SILVA, 2011).

As determinações de As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Pb e Zn devem ser realizadas até que se complete um ano. Após esse período, o teste deverá ser repetido após 6 meses. Dessa forma, cada material ficará como produto a ser continuamente monitorado semestralmente, até que a validade do material seja considerada expirada.

5.8 - Determinação da Umidade Residual

Os resultados de análise em diversos laboratórios de rotina normalmente são expressos como matéria seca. Dessa forma, o método de determinação de umidade deve ser claramente definido e facilmente realizável em cada laboratório. O teor de água na amostra depende da umidade ambiente, que por sua vez varia de acordo com diversos fatores. Se o método escolhido para a determinação da umidade não garantir a obtenção de resultados reprodutíveis, o erro no valor final pode ser significativo.

Primeiramente foi feito um teste de umidade em triplicata em 3 dias diferentes para verificar se haviam possíveis diferenças no valor de umidade residual. Assim, foi escolhido aleatoriamente 1 frasco (nº 153) secou-se o recipiente vazio, durante 2h (em estufa a 105 °C). Retirou-se o recipiente da estufa, colocou no dessecador por 1 h e pesou-se em balança analítica (precisão de 0,0001g). Adicionou-se 1g da amostra a este recipiente e pesou-se novamente. Transferiu-se o recipiente com amostra para a estufa a 105 °C até massa constante (aproximadamente 6 horas), assim, pode-se pesar maior número de amostras e colocá-las na estufa ao final do expediente, retirando-as na manhã seguinte.

Retirou-se da estufa, deixou-se esfriar em dessecador por 1 h e pesou-se o recipiente contendo a amostra seca. Os cálculos foram realizados através das equações 1 e 2 abaixo (NOGUEIRA & SOUZA, 2005):

$$\text{Matéria seca (\%)} = \frac{(B - C)}{(A - C)} \times 100 \quad (1)$$

A: Peso do recipiente + amostra

B: Peso do recipiente + amostra após secagem

C: Peso do recipiente

$$\text{Umidade (\%)} = 100 - \text{matéria seca (\%)} \quad (2)$$

Após esse estudo, foram escolhidos aleatoriamente 3 frascos (nº 24, 33 e 153), seguindo-se o mesmo procedimento descrito acima e cada frasco foi feito em 6 réplicas para determinação da umidade residual média de todos os frascos.

5.9 - Ensaio colaborativo

Existem várias abordagens tecnicamente válidas para se obter a caracterização de um material de referência, que seria o uso de um método primário; dois ou mais métodos independentes por uma organização; medição por meio de uma rede de laboratórios que utilizem métodos de exatidão e uma abordagem para um método específico com estudo interlaboratorial e que forneça os valores de propriedades para esse método (ABNT ISO/GUIA 34, 2004).

Neste trabalho optou-se por realizar o ensaio colaborativo, no qual se obtém os valores de propriedades dos analitos obtidos por diversos laboratórios, utilizando, se possível, diversas técnicas analíticas (ISO, 2006). Além disso, foram aplicadas diversas ferramentas estatísticas como o teste de Grubbs, teste de Cochran e a análise de variância ANOVA.

Assim, foi feita a distribuição dos frascos para ensaio de proficiência em 30 laboratórios nacionais, instituições de pesquisa e universidades.

O programa colaborativo de ensaio de proficiência realizado contou com a participação efetiva de empresas da iniciativa privada, instituições de pesquisa estatais e de ensino superior, num total de 16 participantes que retornaram com os resultados. A Tabela 5.9.1 apresenta os 16 participantes do ensaio colaborativo.

O material candidato foi distribuído a cada um dos participantes, os quais deveriam determinar tantos quantos analitos tivesse interesse e possibilidade, de acordo com os métodos utilizados na rotina de seus próprios laboratórios, com seis repetições.

Para cada participante foram enviados três documentos, um deles foi uma instrução sobre como a amostra foi preparada e uma descrição para a determinação dos analitos de interesse, o outro foi o cadastro do laboratório, descrevendo o tipo de preparo de amostra e técnicas analíticas utilizadas e o último documento foi uma planilha para que eles pudessem digitar os resultados para posterior envio.

TABELA 5.9.1 - Participantes do ensaio colaborativo

A.W. Faber-Castell S.A
CBO Análises Laboratoriais
Embrapa Amapá
Embrapa Pecuária Sudeste
Embrapa Milho e Sorgo
Universidade Estadual Paulista - IBILCE
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
Instituto de Zootecnia / Nova Odessa
Laboratório de Elementos Inorgânicos – LEI/LANAGRO/MG
Laboratório Exata
Moinho PrimorS/A / Labprimor
Universidade Federal do Ceará
Ribersolo Laboratório de Análises do Solo e Foliar
Universidade Federal do Pará
CENA USP / Piracicaba
Universidade de São Paulo – Campus Ribeirão Preto

As técnicas analíticas que foram utilizadas para a determinação dos elementos de interesse nos laboratórios que efetivamente participaram do ensaio colaborativo enviando os resultados foram FAAS, ICP OES, ICP-MS, GF AAS, INAA, colorimetria, espectrofotometria de absorção molecular, fotômetro de chama. Para o preparo de amostras, os laboratórios participantes utilizaram principalmente bloco digestor (sistema aberto) e micro-ondas (sistema fechado).

Capítulo 6

Resultados e Discussão

6 – Resultados e Discussão

6.1 - Avaliação de diferentes doses dos contaminantes (As, Pb, Cd e Cr)

Após sete dias da adição das doses 0; 12,5; 25 e 50 mmol/vaso de solução contendo As, Cd, Cr, e Pb no estudo prévio dos 16 vasos, já se pode observar em vasos nos quais foi colocada a dose de 50 mmol por vaso lesões na parte aérea da planta. Após 30 dias, as folhas ficaram mais danificadas e amareladas, conforme apresentado na Figura 6.1.1.

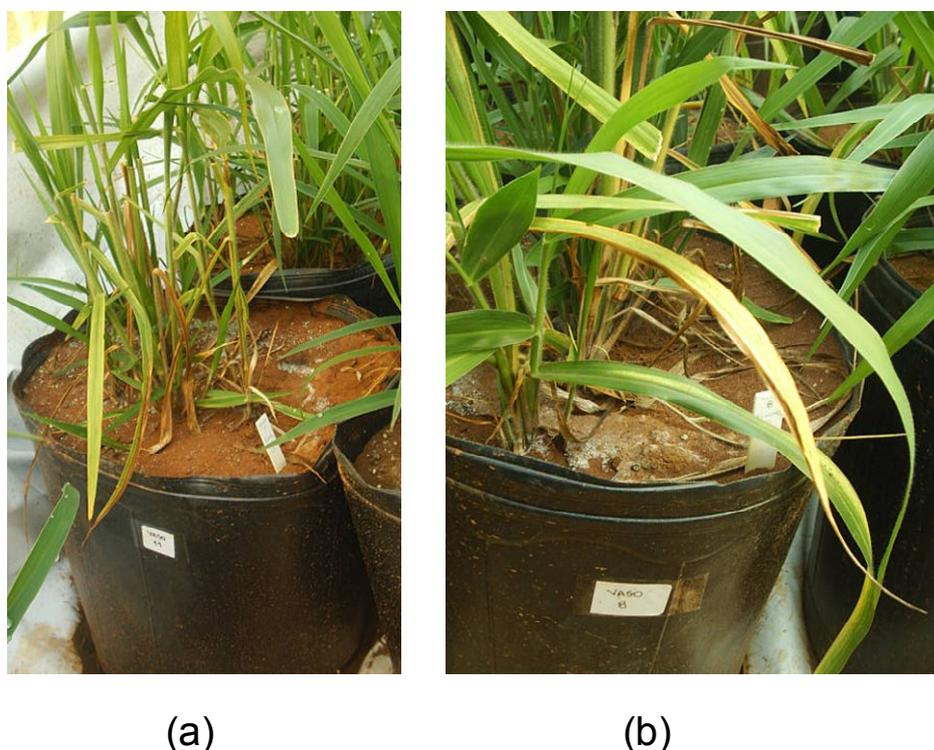


FIGURA 6.1.1 - (a) após 7 dias de adição da dose 50 mmol por vaso; (b) após 30 dias de adição na dose 50 mmol por vaso.

Como resultado inicial sobre critério de avaliação do nível tóxico dos elementos foi definida a redução de 16% na produção de massa seca das plantas comparando a última dose estudada (50 mmol/vaso) com a testemunha. Com base neste critério, as doses de 12,5 mmol/vaso e 25 mmol/vaso não causaram lesões às plantas nos seis cortes realizados. A produção de massa seca é um dos parâmetros que pode ser utilizado na avaliação da toxicidade de uma substância. A Figura 6.1.2

ilustra a diminuição da produção de massa verde de cada concentração antes do primeiro corte dos 16 vasos em estudo.

Nos cortes posteriores o comportamento foi o mesmo, observando-se a diminuição da produção.

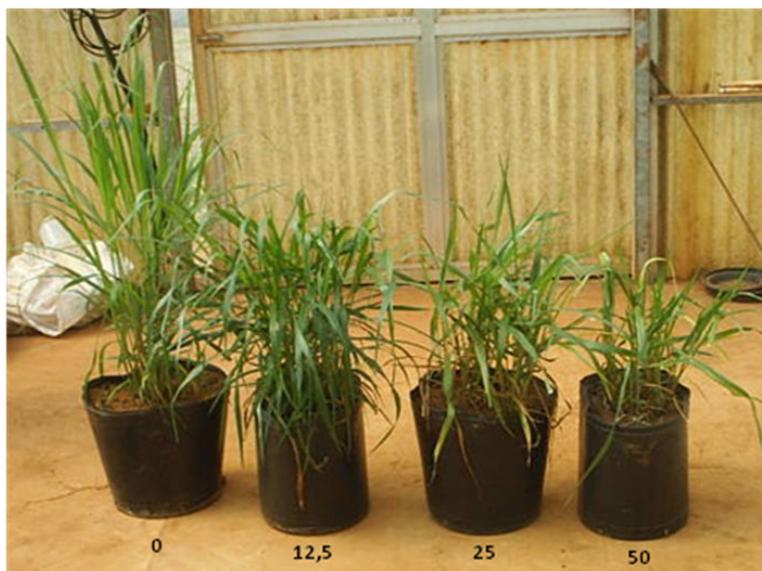


FIGURA 6.1.2 - Produção de massa verde da *Brachiaria brizantha* Stapf. cv. Marandu nas doses 0; 12,5; 25 e 50 mmol por vaso após 60 dias de crescimento.

Na Figura 6.1.3 e Figura 6.1.4, que respectivamente mostram as produções de matéria seca para cada corte e a somatória de todos os seis cortes, destaca-se a redução da produção de matéria seca na dose de 50 mmol por vaso em relação à testemunha. Observou-se também que após o quinto corte, as plantas de dois dos quatro vasos dessa maior dose não se desenvolveram.

Para a dosagem de 25 mmol por vaso foi obtida produção de $17,7 \pm 8,5$ g de matéria seca por vaso, produção equivalente obtida quando foi adicionada dosagem 12,5 mmol por vaso.

Os resultados das Figuras 6.1.3 e Figura 6.1.4 indicam a existência de uma dosagem da mistura de contaminante tolerável pela forrageira, que estaria entre 12,5 e 25 mmol/vaso, na qual a redução da produção de matéria seca não inviabilizaria a obtenção de materiais vegetais contaminados para fins de produção de candidato a material de referência, nas condições empregadas no presente estudo.

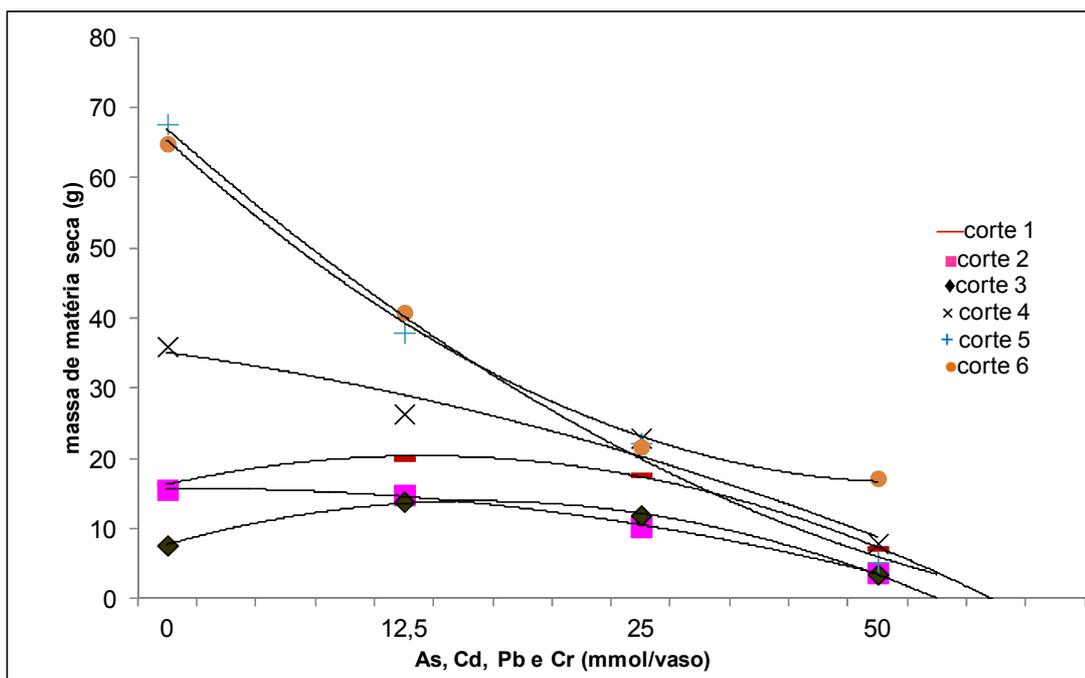


FIGURA 6.1.3 - Produção da massa seca da parte aérea da forrageira (cortes 1, 2, 3, 4, 5, 6).

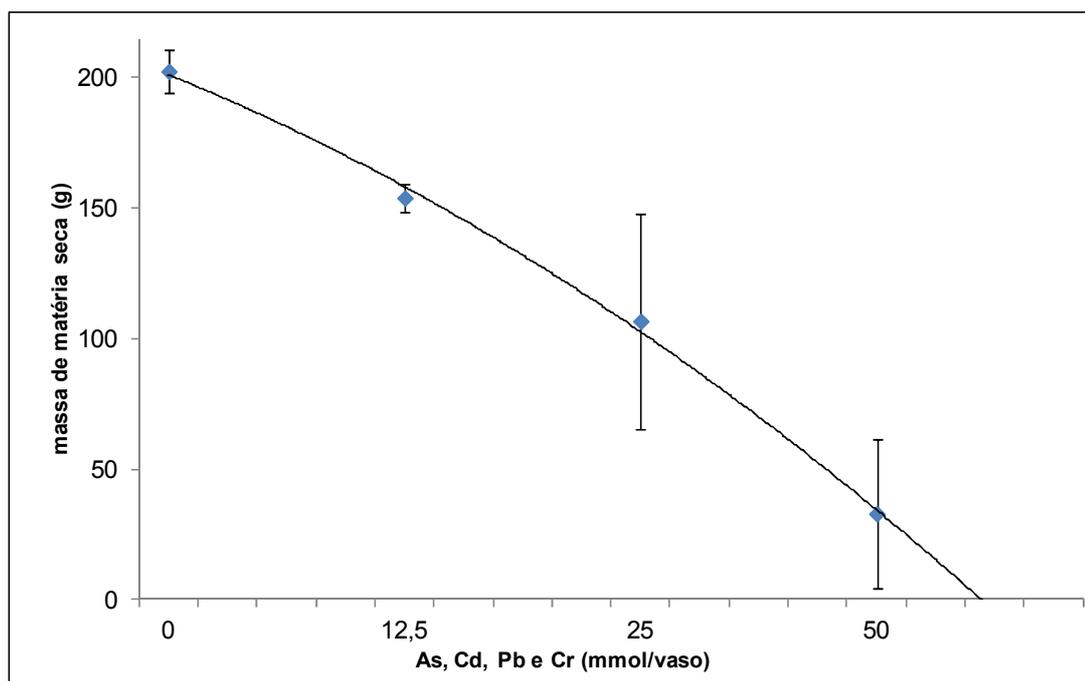


FIGURA 6.1.4 - Somatória da produção da massa seca da parte aérea da forrageira dos cortes 1, 2, 3, 4, 5, 6.

Na Figura 6.1.4, são observados elevados valores de desvio-padrão, o que já era esperado em função de diferenças no crescimento de cada vaso,

resultantes da não rotatividade na casa de vegetação.

Já a partir desses resultados, pode-se dizer que a adição de 25 mmol/vaso de As, Cd, Cr e Pb pode ser feita sem prejudicar de forma crítica o desenvolvimento da forrageira *Brachiaria brizantha*, visando à obtenção de material de referência contendo os contaminantes em sua composição.

Depois do sexto corte da parte aérea foi realizada a abertura dos 16 vasos e separadas as frações do caule, da raiz e do solo. A seguir foi realizada a lavagem, secagem, moagem e digestão das plantas, conforme descrito no item de Procedimento Experimental.

Na Tabela 6.1.1 são apresentados os valores obtidos em relação à recuperação para As, Cd, Cr e Pb dos materiais de referência certificados do NIST. Os melhores valores de recuperações estão indicados em negrito. Para os isótopos estudados foram utilizadas adições ou não de gás H₂ somente no skimmer, pois trabalhos anteriores mostraram que a adição de gases no sampler não minimizava as interferências isobáricas (PEREIRA et al., 2010).

As condições otimizadas para o ICP-MS visando à determinação de As, Cd, Cr e Pb nas amostras dos experimentos apresentados referentes à parte aérea (folhas) e caule foram: modo padrão (sem CRI) e com CRI (60 mL min⁻¹ de H₂) e utilizando somente o ¹⁰³Rh⁺ como padrão interno.

TABELA 6.1.1 - Recuperações (%) obtidas para diferentes condições de operação do ICP-MS (n=3).

Isótopos	Modo Padrão (sem CRI)	Sem CRI ¹⁰³ Rh ⁺	CRI- 60 mL/min H ₂	CRI- 60 mL/min ¹⁰³ Rh ⁺
⁵² Cr ⁺	165	121	102	86
⁷⁵ As ⁺	3000	4000	475	83
¹¹² Cd ⁺	82	101	199	70
²⁰⁶ Pb ⁺	97	46	140	30

TABELA 6.1.2 – Média das concentrações dos isótopos (em mg kg⁻¹), obtidas para os materiais de referência certificados folhas de tomateiro (NIST 1573a)^a e folhas de pessegueiro (NIST 1547)^b (n=3).

Isótopos	Determinado (mg kg ⁻¹)	Certificado (mg kg ⁻¹)
⁵² Cr ⁺	2,04±0,17	1,99±0,06 ^a
⁷⁵ As ⁺	0,093±0,009	0,112±0,004 ^a
¹¹² Cd ⁺	1,53±0,01	1,52±0,04 ^a
²⁰⁶ Pb ⁺	0,84±0,02	0,87±0,03 ^b

Na Tabela 6.1.2 são apresentadas as médias das concentrações dos isótopos, obtidas por ICP-MS, para os materiais de referência certificados folhas de tomateiro (NIST 1573a) e folhas de pessegueiro (NIST 1547). Foi realizado o teste *t*-student não pareado (BARROS et al., 2001). Assim, os quatro elementos em estudo ficaram a um nível de 95% de confiança, não apresentando diferenças significativas entre os resultados obtidos e os valores certificados. Desta forma, pode-se confirmar a exatidão do método de decomposição e determinação para ICP-MS.

Os limites de detecção e quantificação foram calculados considerando-se as medidas da razão do sinal analítico / sinal de fundo (SBR) e a concentração do analito que produz um sinal líquido (altura de pico) equivalente à intensidade do sinal de fundo (BEC). As equações envolvidas foram deduzidas conforme sugerido por THOMSEN et al. (2000). O BEC e o SBR são calculados pelas equações 3 e 4:

$$SBR = \frac{I_{sr} - I_{branco}}{I_{branco}} \quad (3)$$

$$BEC = \frac{C_{sr}}{SBR} \quad (4)$$

No qual, C_{sr} é a concentração da solução de referência mais concentrada, I_{branco} é a intensidade de emissão (ICP OES) ou contagens (ICP-MS) do branco analítico e I_{sr} é a intensidade de emissão ou contagens da solução de referência mais concentrada.

O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) são calculados aplicando-se as equações 5 e 6 e considerando-se o BEC:

$$LOQ = \frac{10BEC \times RSD}{100} \quad (5)$$

$$LOD = \frac{3BEC \times RSD}{100} \quad (6)$$

Onde RSD é o desvio padrão relativo para 10 medidas da solução do branco analítico.

Os limites de detecção e quantificação, RDS (%) para leitura de 10 amostras em um mesmo dia (repetibilidade), RSD (%) para leitura de 10 amostras em dias diferentes (reprodutibilidade) e as incertezas de medição associadas às leituras por ICP-MS estão apresentados na Tabela 6.1.4. As incertezas apresentadas são as incertezas expandidas, calculadas usando fator de abrangência $k=2$, que fornece nível de confiança de aproximadamente 95%.

Foram realizados os procedimentos para a validação do método por ICP-MS para As, Cd, Cr e Pb em amostras de forrageira (TAVERNIERS et al., 2004; CHUDZINSKA et al., 2012) e as incertezas de medição foram calculadas considerando os procedimentos de pesagem, decomposição, volume dos digeridos, curva de calibração e contagem ou emissão do sinal analítico (EURACHEM/CITAC, 2002; MOREIRA, 2010c; KRUG, 2008). A faixa linear de trabalho se apresentou entre 1 e 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ com R^2 próximo a 0,999 para os contaminantes As, Cd, Cr e Pb. O estudo da seletividade também foi realizado, comparando-se a curva analítica em meio ácido nítrico e no meio da amostra, sendo as curvas paralelas, não havendo efeito de matriz. Desta forma, foi possível realizar a calibração externa.

TABELA 6.1.3 – Valores dos limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), RDS da repetibilidade^a, RSD da reprodutibilidade^b e as incertezas de medição (U) para ICP-MS.

Elementos	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	RSD(%) ^a	RDS(%) ^b	U (%)
⁵² Cr ⁺	0,07	0,22	4,5	15	0,1
⁷⁵ As ⁺	0,081	0,271	4,9	13	0,1
¹¹² Cd ⁺	0,157	0,524	1,9	5,9	0,1
²⁰⁶ Pb ⁺	0,054	0,180	4	13	0,1

De acordo com a Tabela 6.1.3, os valores de RDS da repetibilidade e RSD da reprodutibilidade não excederam os valores de 5% e 15%, respectivamente, que são considerados os máximos aceitáveis de acordo com (CHUDZINSKA et al., 2012).

Na Tabela 6.1.4 são apresentados os resultados obtidos a partir do primeiro e do segundo cortes do experimento inicial, o qual definiu a dosagem de contaminantes a ser adicionada ao solo para a produção do material vegetal.

TABELA 6.1.4 - Teores de contaminantes na dose 25 mmol/vaso (16 vasos; mg kg⁻¹; n = 4) e valor de peso seco (g) para primeiro e segundo corte

25 mmol/vaso	Peso seco	⁵²Cr⁺	⁷⁵As⁺	¹¹²Cd⁺	²⁰⁶Pb⁺
1º corte	17,7±8,5	0,7±0,2	0,7±0,6	32±11	1,6±0,4
2º corte	10,3±4,2	0,6±0,2	0,9±0,2	7±2	2,3±0,4

Através desses resultados de concentração dos contaminantes e produção de peso seco podemos escolher a concentração de 25 mmol por vaso como a ideal, pois a produção de material com a adição desta dosagem de contaminantes foi próxima (considerando-se também o desvio-padrão dos vasos) a da adição de 12,5 mmol por vaso. Também foi observada alta absorção na planta para 25 mmol por vaso, principalmente em relação ao cádmio que apresenta um coeficiente de translocação para a parte aérea muito maior quando comparado aos outros contaminantes em estudo (ALLOWAY, 1990). Assim, a dosagem 25 mmol/vaso foi a dosagem escolhida para a produção da forragem contendo os contaminantes, nos demais vasos inicialmente preparados.

Nas Figuras 6.1.5 a 6.1.9 são apresentados os resultados obtidos após a determinação por ICP-MS para os seis cortes efetuados durante o período do estudo, assim como do caule nos 16 vasos, para cada contaminante adicionado, com valores das médias obtidos através de quatro réplicas.

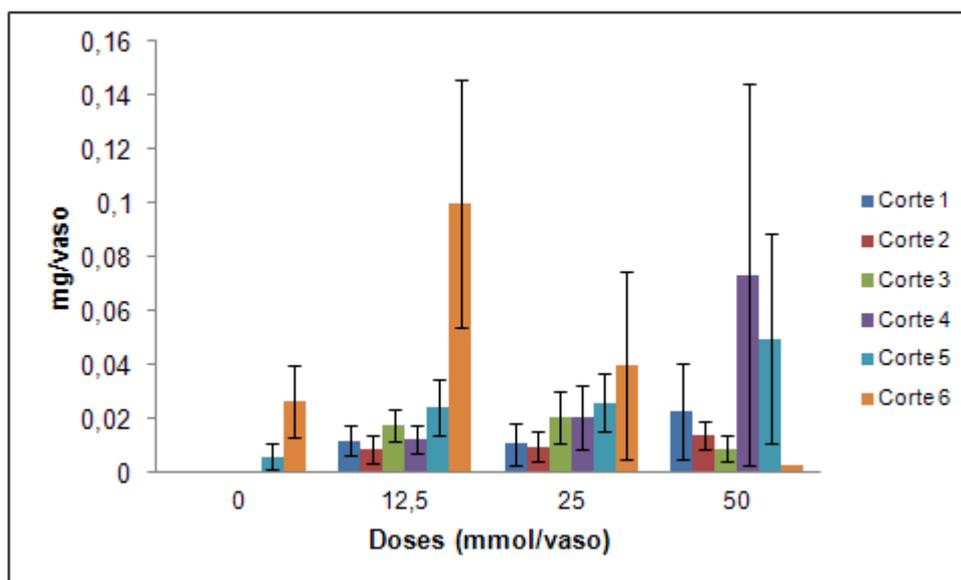


FIGURA 6.1.5 Teor extraível de arsênio na parte aérea ao longo dos seis cortes estudados.

É importante ressaltar que este experimento teve duração de um ano e meio na casa de vegetação e cada corte foi realizado após aproximadamente 60 dias de crescimento. Após os cortes eram sempre feitas adubações com N, P e K. Para obter o teor extraível de cada contaminante nos seis cortes estudados, relacionou-se o peso seco (g) de cada corte com a concentração (mg kg^{-1}), obtidos por ICP-MS. Através dos resultados apresentados na Figura 6.1.5 foi observada para arsênio uma absorção mais contínua entre os diferentes cortes e nas diferentes dosagens. Além disso, houve maior teor extraível de arsênio na última dose estudada, como o esperado. Observaram-se altas extrações de As no sexto corte da dose 12,5 mmol/vaso e no corte 4 e 5 na última dose. Isso somente pode ser explicado pelos menores teores dos demais contaminantes, principalmente o Cd nos últimos cortes, o que possibilitaria menor competição, facilitando de alguma forma uma maior extração de As para a parte aérea da planta. Pode-se observar também a presença de As na testemunha para o último corte que pode ser explicada por possível contaminação durante o crescimento das plantas em casa de vegetação.

Comparando o teor extraível de arsênio na parte aérea na Figura 6.1.5 da planta com o teor extraível desse elemento no caule, na Figura 6.1.9, pode ser observada uma maior extração principalmente nas dosagens 25 e 50 mmol/vaso, evidenciando assim pouca translocação para a parte aérea. O arsênio e o fósforo são análogos quimicamente no solo, porém na planta possuem comportamento

diferenciado (TU e MA, 2003). A distribuição do As na planta se dá no sentido inverso ao do P, que é bastante móvel, sendo redistribuído com facilidade dos tecidos mais velhos para os mais novos, mas isso varia muito dependendo da espécie da planta (MELO et al., 2009).

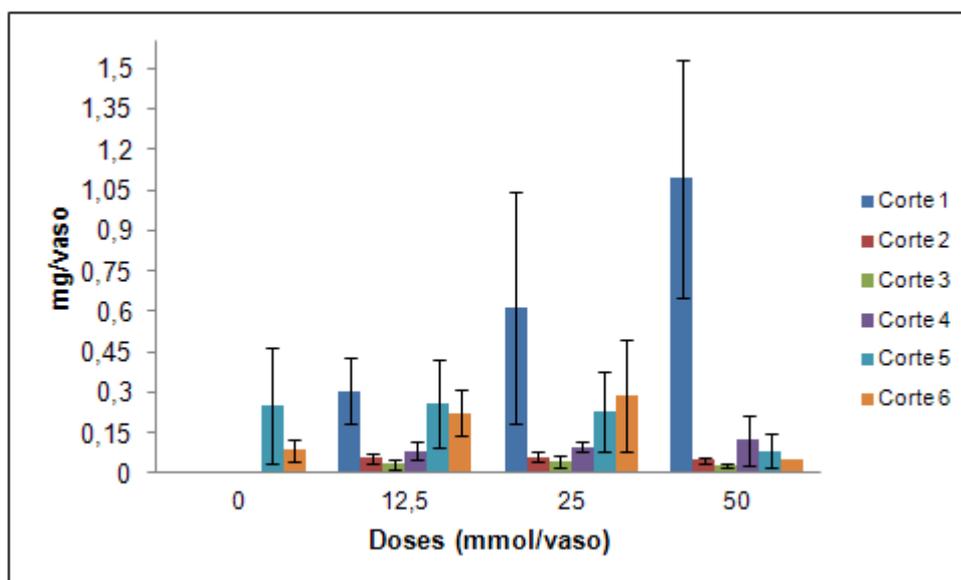


Figura 6.1.6 Teor extraível de cádmio na parte aérea ao longo dos seis cortes estudados.

Observando-se o teor retirado de cádmio na Figura 6.1.6 na parte aérea, pode-se observar que no primeiro corte houve alta absorção em relação aos cortes seguintes, devido ao seu elevado coeficiente de translocação, conforme mencionado em vários estudos (NAGAJYOTI et al, 2010; BAH et al, 2010; MALAVOLTA, 1994). Por isso, o cádmio é o elemento, entre os metais tóxicos, que tem apresentado as mais expressivas taxas de aumento no ambiente (ALLOWAY, 1990; NAGAJYOTI et al, 2010), e muitas propriedades do sistema solo tem sido relatadas como de grande importância na solubilidade e movimentação do Cd no perfil do solo e também na sua absorção pela planta (PAIVA et al., 2001). Entre elas estão o pH do solo, a capacidade de troca de cátions, o teor de matéria orgânica, o teor de argila, o potencial redox, o teor de cálcio e a presença de outros metais no solo (KABATA-PENDIAS e PENDIAS, 2001; ALLOWAY, 1990; NAGAJYOTI et al., 2010).

Comparando-se o teor extraível de cádmio na parte aérea na Figura 6.1.5 da planta com o teor extraível desse elemento no caule, na Figura 6.1.9,

podemos observar uma extração considerada para todas as doses estudadas em relação aos outros contaminantes. Esse alto teor indica o elevado potencial de translocação desse elemento (NAGAJYOTI et al, 2010).

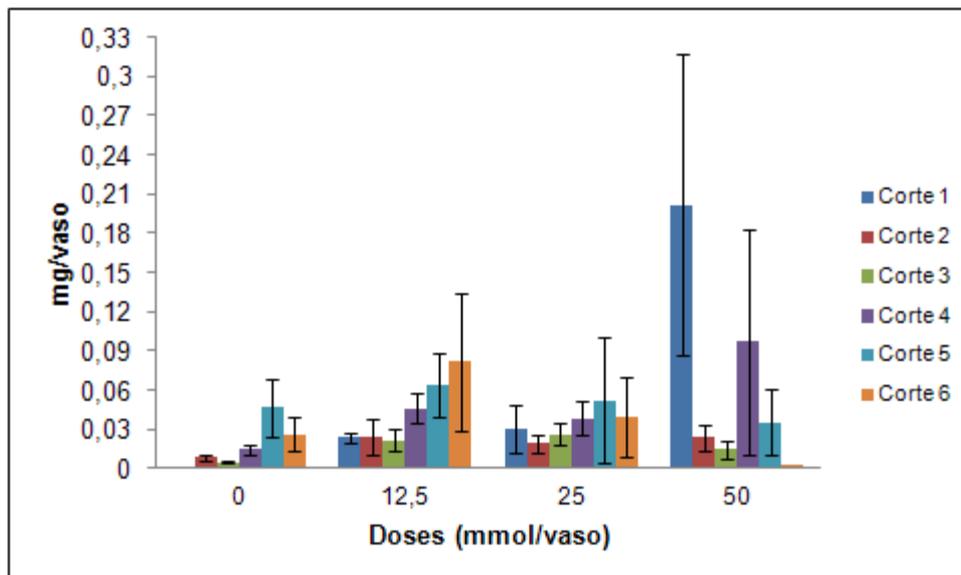


Figura 6.1.7 Teor extraível de chumbo na parte aérea ao longo dos seis cortes estudados.

De acordo com a Figura 6.1.7, o teor de chumbo extraível na parte aérea pequeno aumentou conforme o aumento das doses, porém foi baixo comparável ao teor de arsênio na parte aérea na Figura 6.1.5 e ao cromo (Figura 6.1.8). Porém, pode-se observar que no caule (Figura 6.1.9) o teor extraível foi comparável ao cádmio.

Segundo MALAVOLTA (2006) o Pb se acumula na endoderme, que atua como barreira parcial, e nas paredes da célula das raízes, e, em certas condições, formam-se precipitados amorfos identificados como fosfato de chumbo, o que impede sua translocação para a parte aérea.

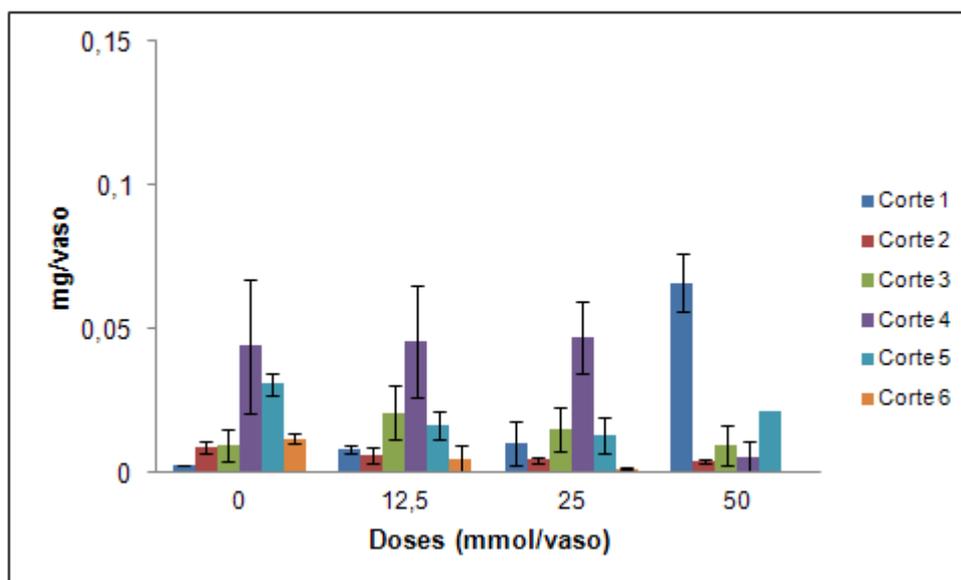


Figura 6.1.8 - Teor extraível de cromo na parte aérea ao longo dos seis cortes estudados.

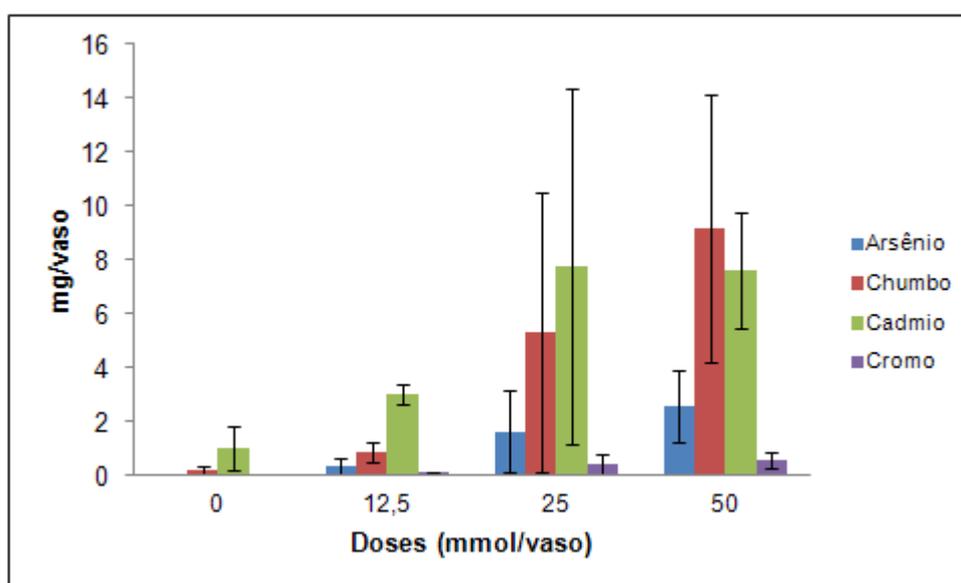


Figura 6.1.9 - Teor extraível de As, Cd, Cr e Pb no caule após o sexto corte.

De acordo com a Figura 6.1.8 pode-se observar baixo teor extraível de cromo na parte aérea em relação aos outros elementos. Isso também pode ser observado no caule, como mostra a Figura 6.1.9 para o teor extraível no caule.

A seguir, estão mostrados nas Figuras 6.1.10 a 6.1.11 os resultados para a raiz e o solo nos 16 vasos, obtidos por ICP OES para cada contaminante estudado.

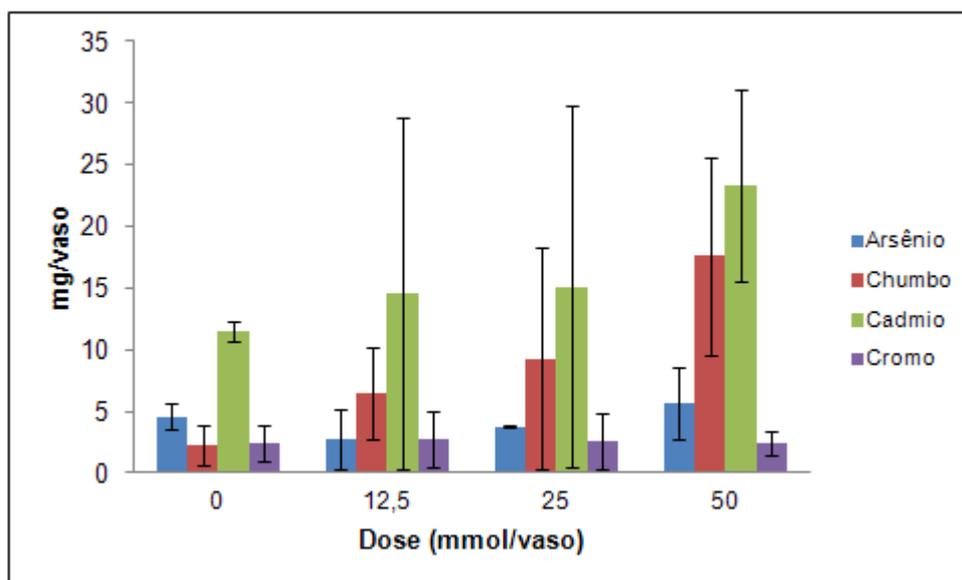


Figura 6.1.10 - Teor extraível de As, Cd, Cr e Pb na raiz após o sexto corte.

Os elevados teores de Cd, na raiz, no caule e na folha, podem estar associados à toxicidade do elemento, pois os valores alcançados são muito superiores à faixa de 5 a 30 mg kg⁻¹ (KABATA-PENDIAS e PENDIAS, 2001; PAIVA et al., 2001). Na parte aérea, nas doses 25 e 50 mmol/vaso, as concentrações de Cd foram superiores a esta faixa e no caule e na raiz foram superiores em todas as doses estudadas.

O chumbo foi o segundo elemento com alto teor extraível na raiz, conforme mostra a Figura 6.1.10. Isso pode ser explicado, alguns metais concentram-se nas raízes, não sendo transportados para a parte aérea. Mesmo em solos mais ácidos a mobilidade do chumbo é baixa (SILVA et al., 1998).

Os teores de As nas raízes em todas as doses estudadas foram bastante elevados em relação às outras partes da forrageira, indicando que há mecanismos de compartimentalização, a fim de reduzir a translocação do As aos tecidos jovens da parte aérea (MELO et al., 2009). O mesmo comportamento foi observado para o Cr, que permaneceu em maior proporção nas raízes, sendo pouco transportado à longa distância para a parte aérea (KABATA-PENDIAS e MUKHERJEE, 2007) e o elemento com menor teor extraível na raiz. É importante citar também que houve um menor crescimento da raiz na dose de 50 mmol por vaso em relação ao crescimento das raízes nas outras dosagens estudadas.

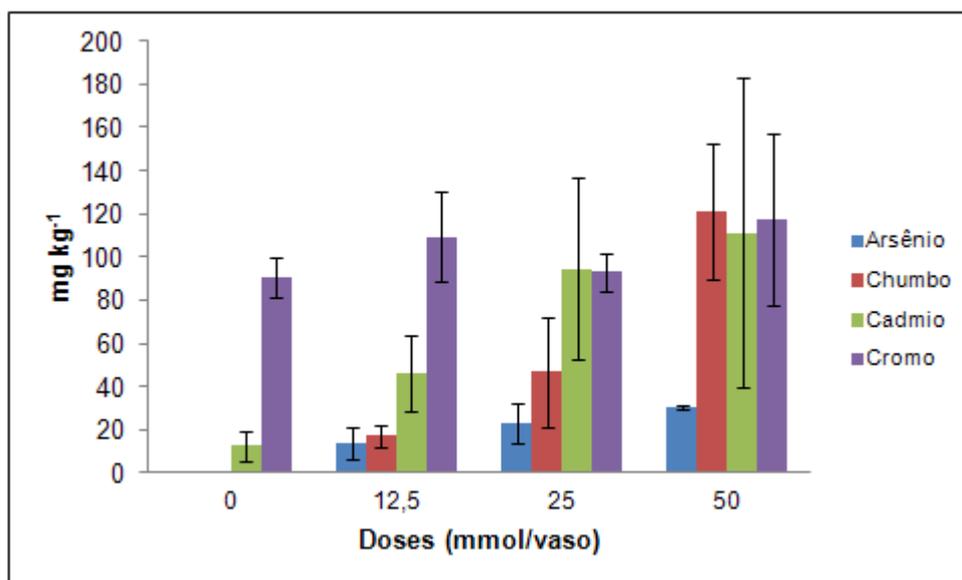


Figura 6.1.11 - Teores em mg kg^{-1} de As, Cd, Cr e Pb no solo após o sexto corte.

Após o último corte observou-se, através dos resultados da Figura 6.1.11 as concentrações finais de As, Cd, Cr e Pb que permaneceram no solo dos vasos estudados. Como era de se esperar, foram encontrados altos teores para todos os elementos, principalmente na dose 50 mmol/vaso .

Ao se compararem os teores totais de Cd, Cr, Pb no solo com os limites críticos estabelecidos pela USEPA (Agência de Proteção Ambiental dos EUA) ($\text{Cd} = 20$, $\text{Cr} = 1.530$ e $\text{Pb} = 180 \text{ mg kg}^{-1}$) e pela CETESB (2005) ($\text{Cd} = 3$, $\text{Cr} = 150$, $\text{Pb} = 180 \text{ mg kg}^{-1}$), verifica-se que os teores desses elementos neste estudo estavam dentro dos valores permitidos para áreas agrícolas, mesmo com as aplicações dos sais desses contaminantes. Somente o cádmio foi encontrado com valores de concentração variando de 30 a 180 mg kg^{-1} nas três doses estudadas. O teor de As no solo também pode ser considerado normal, quando comparado com o intervalo de valor para solos não-contaminados apresentado no boletim da WHO (organização mundial de saúde): $1\text{-}40 \text{ mg kg}^{-1}$ (CAMPOS et al., 2007).

Através desses resultados pode-se também concluir que a forrageira (*Brachiaria brizantha* Stapf cv. Marandu) pode acumular e ser considerada resistente a esses elementos adicionados ao solo.

Alguns métodos de tratamento para este solo contaminado, principalmente em relação ao excesso de cádmio observado, poderiam ser a incineração e a estabilização alcalina com calcário ou outros reagentes alcalinos (SPADOTTO e RIBEIRO, 2006).

6.2 – Preparo do material candidato a material de referência

Após adição de 25 mmol/vaso nos vasos previamente preparados com solo corrigido, foram realizados dois cortes, o primeiro após 60 dias e o segundo após 120 dias. Todo o material vegetal relacionado somente a parte aérea da planta foi lavado com água desmineralizada e seco em estufa a 45°C, sendo a seguir moído em moinho de facas e moinho ultracentrífugo e homogeneizado, feito envase em 360 frascos de vidro âmbar e 100 frascos de plástico, resultando em 20 kg de material seco e moído. Depois disso foi feita a irradiação com raios gama, avaliação da distribuição do tamanho de partícula e os estudos de preparo de amostra em bloco digestor, massa mínima, estudos de homogeneidade, estabilidade e caracterização do candidato a material de referência seguindo as ISO Guias 30 a 35.

6.2.1 – Estudo da distribuição do tamanho de partículas

Primeiramente foi realizada uma moagem em moinho de facas com uma peneira de 500 µm para em seguida realizar uma análise preliminar da distribuição do tamanho de partículas (Figura 6.2.1.1) após esta primeira moagem.

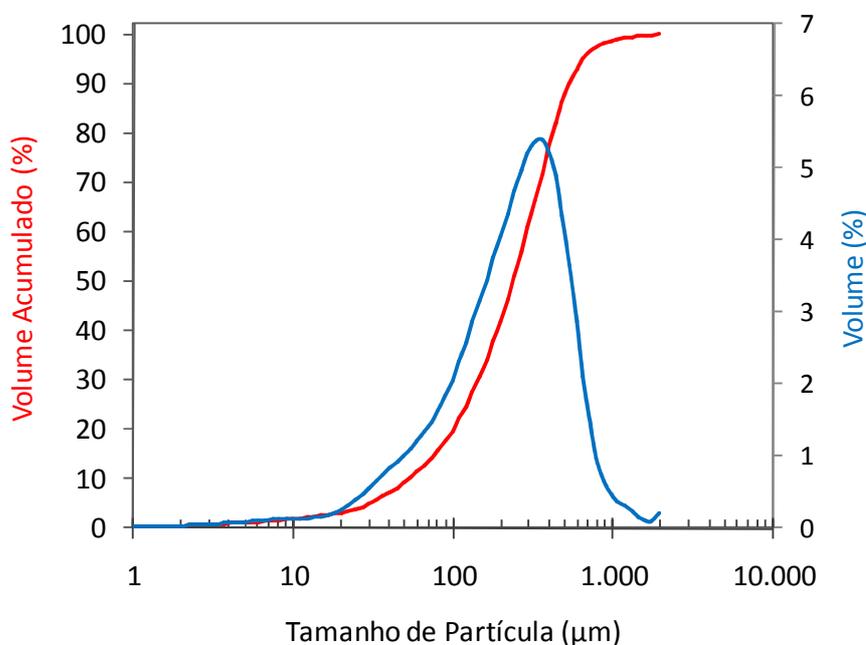


FIGURA 6.2.1.1 - Distribuição do tamanho de partículas para o material candidato a material de referência após moagem em moinho de facas (com peneira de 500 µm).

Observou-se que o tamanho de partícula ainda era considerado alto para produção do material. Foi então testado um pouco da amostra, que havia sido moída em moinho de facas, em moinho ultracentrífugo com peneira de 250 μm . Na Figura 6.2.1.2 é apresentado o resultado referente ao tamanho de partícula. Esse resultado mostrou que 90% do material se encontram abaixo de 350 μm . Assim, os 20 kg de material seco e moído no moinho de facas foram moídos novamente no moinho ultracentrífugo.

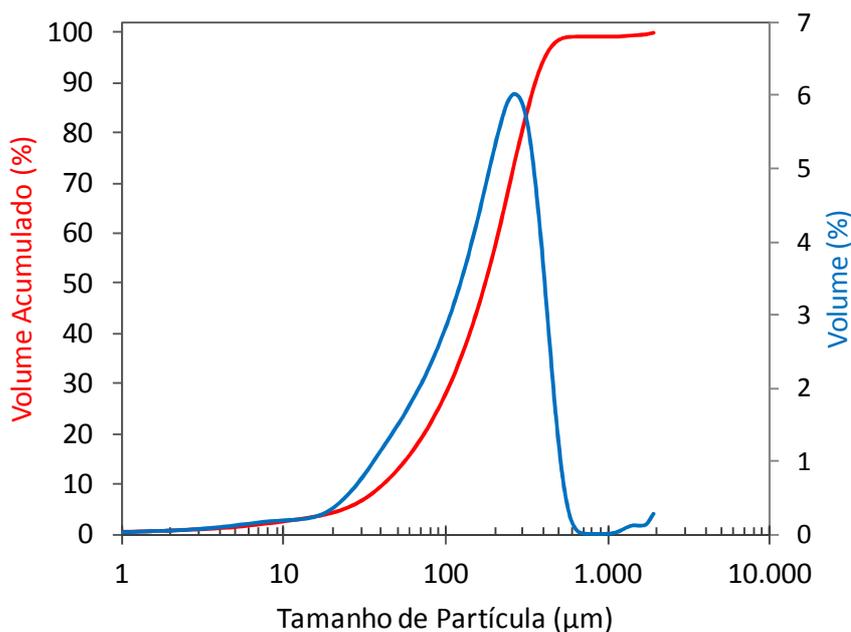


FIGURA 6.2.1.2 - Distribuição do tamanho de partícula para o material candidato a material de referência para peneira de 250 μm .

Após moagem, homogeneização e envase dos 20 kg de amostra de forrageira, foram sorteados três frascos para a realização de nova medida de tamanho de partícula. Foram realizadas três leituras em cada um dos três frascos estudados, sendo obtido como média 280 μm . Todos os resultados das três réplicas de cada frasco apresentaram-se semelhantes. Assim, na Figura 6.2.1.3 é apresentada a distribuição do tamanho de partícula de uma dessas réplicas. Concluiu-se, dessa forma, que 90% das partículas apresentaram-se menores que 280 μm .

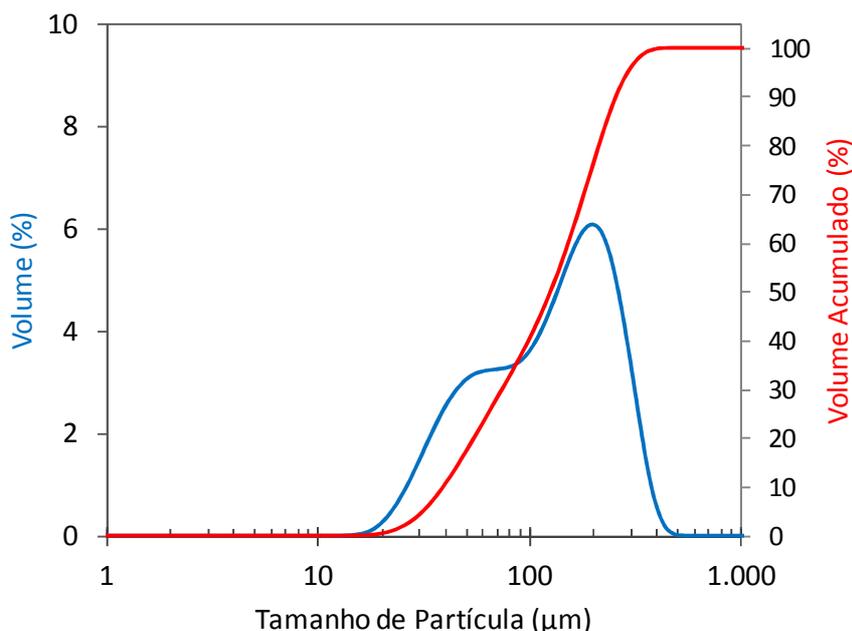


FIGURA 6.2.1.3 - Distribuição do tamanho de partícula para o material candidato a material de referência (com peneira de 250 µm).

6.3 - Preparo de amostra para o bloco digestor e micro-ondas em determinação por ICP OES

A composição química e a determinação dos teores de minerais na forrageira são importantes para o entendimento da influência fisiológica na nutrição animal e a toxicidade dos elementos traço. Os bovinos necessitam de minerais que são considerados essenciais para a sua saúde e para a manutenção da fertilidade (NICODEMO et al., 2008). Devido à presença de compostos orgânicos, várias abordagens usando digestões apropriadas, como digestões assistidas por radiação micro-ondas (CARRILHO et al., 2002; ARAÚJO et al., 2002) e digestão em bloco (NOGUEIRA & SOUZA, 2005) foram estudadas para determinar o teor total dos analitos estudados na forrageira candidata a material de referência.

Na Tabela 6.3.1 estão os resultados obtidos pelos métodos de digestão avaliados, digestões assistidas por radiação micro-ondas e digestão em bloco digestor para Ca, Cd, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn.

TABELA 6.3.1 - Resultados e RSD obtidos pelos métodos de digestão assistida por radiação micro-ondas e digestão em bloco digestor para amostra candidata a material de referência, por ICP OES (n=3).

Elementos	Bloco (m±s)	RSD (%)	Micro-ondas (m±s)	RSD (%)
Ca (g kg ⁻¹)	4,21±0,02	0,5	4,69±0,01	0,2
Cd (mg kg ⁻¹)	17,4±0,1	0,8	22,0±0,5	2,0
Cu (mg kg ⁻¹)	3,1±0,1	2,8	3,1±0,1	2,7
Fe (mg kg ⁻¹)	97,0±7,2	7,4	87,6±6,3	7,1
Mg (g kg ⁻¹)	2,5±0,1	0,2	2,6±0,1	3,8
Mn (mg kg ⁻¹)	73,9±0,3	0,4	73,4±0,7	1,0
Na (g kg ⁻¹)	0,20±0,04	19	0,20±0,01	3,9
P (g kg ⁻¹)	0,69±0,01	1,6	0,70±0,02	2,9
Zn (mg kg ⁻¹)	8,8±0,3	3,0	7,6±0,6	7,9
K (g kg ⁻¹)	12,5±0,3	2,4	11,5±0,2	1,3

Foi realizado o teste *t*-student pareado que compara as médias obtidas da digestão em bloco e em micro-ondas para cada elemento (BARROS et al., 2001) e, assim, Ca, Cd, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn ficaram a um nível de 95% de confiança, não apresentando diferenças significativas entre os resultados obtidos nos diferentes métodos de digestão.

Foram escolhidas três linhas de emissão em ICP OES para cada elemento, e através das melhores recuperações obtidas pelos materiais de referência certificados, foram escolhidas as linhas de emissão para determinação das concentrações de Ca, Cd, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn. Na Tabela 6.3.2 são apresentados os resultados obtidos, que se apresentaram estatisticamente semelhantes a um nível de confiança de 95% aos valores certificados após realizado o teste *t*-student não pareado (BARROS et al., 2001). Desta forma, pode-se confirmar a exatidão do método de decomposição e determinação para ICP OES.

TABELA 6.3.2 - Média das concentrações, obtidas por ICP OES, para os materiais de referência certificados de folhas de tomateiro (NIST 1573a)^a e folhas de pessegueiro (NIST 1547)^b (n=3).

Elementos	Determinado (mg kg ⁻¹)	Certificado (mg kg ⁻¹)
Ca	50988±1437	5,05±0,09 (%) ^a
Cu	4,70±0,17	4,7±0,14 ^a
Fe	349±8	368±7 ^a
Mg	4075±116	0,432±0,008 (%) ^b
Mn	222±10	246±8 ^a
Na	22,90±2,57	24±2 ^b
P	2199±24	0,216±0,004 (%) ^a
Zn	16,0±1,40	17,9±0,14 ^b
K	23364±511	2,43±0,03 (%) ^b

Os limites de detecção e quantificação estão apresentados na Tabela 6.3.3 e os resultados encontrados estão de acordo com VIEIRA (2007), que otimizou as condições do equipamento (ICP OES), as quais foram utilizadas neste trabalho.

TABELA 6.3.3 - Valores dos limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) e as incertezas de medição (*U*) para amostra de forrageira em ICP OES.

Elementos	LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)	<i>U</i> (%)
Ca	0,1	0,2	0,1
Cr	0,01	0,02	0,1
As	0,09	0,3	0,4
Cd	0,02	0,1	0,3
Pb	0,07	0,23	0,1
Cu	0,004	0,015	0,2
Fe	0,04	0,15	0,1
Mg	0,01	0,02	0,1
Mn	0,02	0,07	0,1
Na	0,006	0,021	0,24
P	0,01	0,03	0,13
Zn	0,02	0,07	0,12
K	0,01	0,03	0,10

6.4 - Estimativa da massa mínima da amostra candidada a material de referência

Na Tabela 6.4.1 são apresentados os resultados da média das concentrações obtidos por ICP-MS para os contaminantes As, Cd, Cr e Pb e por ICP OES para Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn utilizando-se porções amostradas de 100 mg, 150 mg e 200 mg, em triplicata.

TABELA 6.4.1 – Frações de massa de As, Cd, Cr, Pb Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn obtidas nas porções amostradas em digestão em micro-ondas com cavidade (n=3).

Elementos	100 mg (m±s)	RSD(%)	150 mg (m±s)	RSD (%)	200 mg (m±s)	RSD (%)
As (mg kg ⁻¹)	3,3±1,6	48	2,4±0,3	11	2,57±0,12	4,6
Cd (mg kg ⁻¹)	28,7±11,9	41	20,7±0,5	2,6	22,6±0,5	2,3
Cr (mg kg ⁻¹)	3,2±1,7	52	2,4±0,6	26	2,8±0,2	7,2
Pb (mg kg ⁻¹)	9,7±4,3	45	6,3±1,0	16	5,9±0,7	12,7
Ca (g kg ⁻¹)	5,1±0,6	12	5,6±0,12	2,2	5,7±0,06	0,9
Cu (mg kg ⁻¹)	3,1±0,2	7,7	2,9±0,28	9,6	2,9±0,07	2,3
Fe (mg kg ⁻¹)	70±3,0	4,3	69±0,3	0,5	71±0,4	0,5
Mg (g kg ⁻¹)	2,6±0,1	3,2	2,93±0,22	7,4	2,78±0,04	1,3
Mn (mg kg ⁻¹)	59±2,4	4,1	63±2,7	4,3	63±1,3	1,9
Na (g kg ⁻¹)	0,15±0,002	1,0	0,15±0,02	1,4	0,15±0,02	1,0
P (g kg ⁻¹)	0,99±0,02	2,3	1,09±0,04	12	0,97±0,01	1,2
Zn (mg kg ⁻¹)	7,5±0,6	8,6	6,5±0,5	7,8	7,6±0,6	7,9
K (g kg ⁻¹)	12±1,4	12	13±0,6	4,6	14±1,1	7,7

Para verificar se os resultados apresentam os mesmos valores médios para cada elemento estudado em diferentes massas foi aplicada a análise de variância ANOVA de fator único para avaliação estatística dos resultados e comparou-se o valor do $F_{crítico}$ (F_c) em relação ao valor do $F_{analítico}$ (F) para cada elemento.

Observou-se que todas as médias das diferentes massas apresentaram-se dentro do intervalo de confiança de 95% através dos valores de F e F_c encontrados na Tabela 6.4.2, mostrou que para todos os elementos o $F_{analítico}$ (F) foi menor que o $F_{crítico}$ (F_c), indicando, assim igualdade entre as médias.

Considerando-se os valores dos desvios padrão relativos (RSD) em porcentagem indicados na Tabela 6.4.1, observou-se que estes estavam altos para os contaminantes As, Cd, Cr e Pb para a massa de 100 mg e 150 mg. Dessa forma, recomenda-se uma massa mínima para 200 mg para As, Cd, Cr e Pb.

Já para Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, e Zn 100 mg pode ser utilizado como massa mínima para as determinações.

TABELA 6.4.2 - Estatísticas da ANOVA para os valores médios de cada massa para o estudo de massa mínima de amostra.

Elemento	Fonte de variação	Média Quadrática	F	F_c^a
As	Entre	0,684379	0,779409	5,143253
	Dentro	0,878074		
Ca	Entre	487035,2	2,919465	5,143253
	Dentro	166823,4		
Cd	Entre	52,73034	1,109139	5,143253
	Dentro	47,54168		
Cr	Entre	0,530696	0,484771	5,143253
	Dentro	1,094737		
Cu	Entre	0,02841	0,615182	5,143253
	Dentro	0,046181		
Fe	Entre	1,84539	1,128259	5,143253
	Dentro	1,635609		
Mn	Entre	14,15586	2,860114	5,143253
	Dentro	4,949405		
Mg	Entre	64441,21	3,47219	5,14325285
	Dentro	18559,24		
Na	Entre	16,41771	0,115171	5,143253
	Dentro	142,5502		
K	Entre	1814662	1,676497	5,143253
	Dentro	1082413		
P	Entre	20365,05	3,860558	5,143253
	Dentro	5275,158		
Pb	Entre	13,46625	1,979912	5,143253
	Dentro	6,801437		
Zn	Entre	1,014863	0,836764	5,143253
	Dentro	1,212842		

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

6.5 - Avaliação da homogeneidade dentro e entre frascos

No desenvolvimento de material candidato a material de referência, o teste de homogeneidade deve ser planejado para se poder conhecer as variabilidades devido à possível não homogeneidade dos analitos no material embalado, a ser disponibilizado ao usuário (MOREIRA et al., 2010a; CARIONI et al., 2011; CHUI et al., 2005).

Para determinar a homogeneidade do material candidato a material de referência, primeiramente foi realizada uma análise de variância ANOVA de fator único e o $F_{crítico}$ foi comparado ao $F_{analítico}$, tanto para se verificar se haviam diferenças significativas nas concentrações dos elementos ao longo dos frascos estudados, bem como para se estimar a contribuição da variação entre frascos à incerteza combinada de certificação a ser discutida em item posterior.

Em termos estatísticos, a hipótese nula H_0 é a de que não há diferenças significativas, com intervalo de confiança de 95% entre os valores das determinações em cada um dos frascos amostrados. A hipótese alternativa H_1 é a de que há diferenças significativas com um intervalo de confiança de 95% entre os frascos amostrados. Quando o $F_{crítico}$ é maior que o $F_{analítico}$, aceita-se H_0 e o material é considerado homogêneo. Por outro lado, quando $F_{crítico}$ é menor que o $F_{analítico}$, rejeita-se H_0 e o material não é considerado homogêneo (BARROS et al., 2001).

A seguir são apresentadas as Figuras 6.5.1 a 6.5.13 que representam o estudo de homogeneidade entre frascos para cada parâmetro avaliado. Neles, têm-se as réplicas, os limites superiores e inferiores em intervalos de confiança a 95% (linha tracejada vermelha). Em cada figura existem os marcadores em vermelho que representam a homogeneidade dentro do frasco e os marcadores em azul correspondem a cada frasco do estudo da homogeneidade entre frascos. Os resultados mostram que os valores indicados estão próximos ao valor da mediana (linha preta) para As, Cd, Cr, Pb, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn.

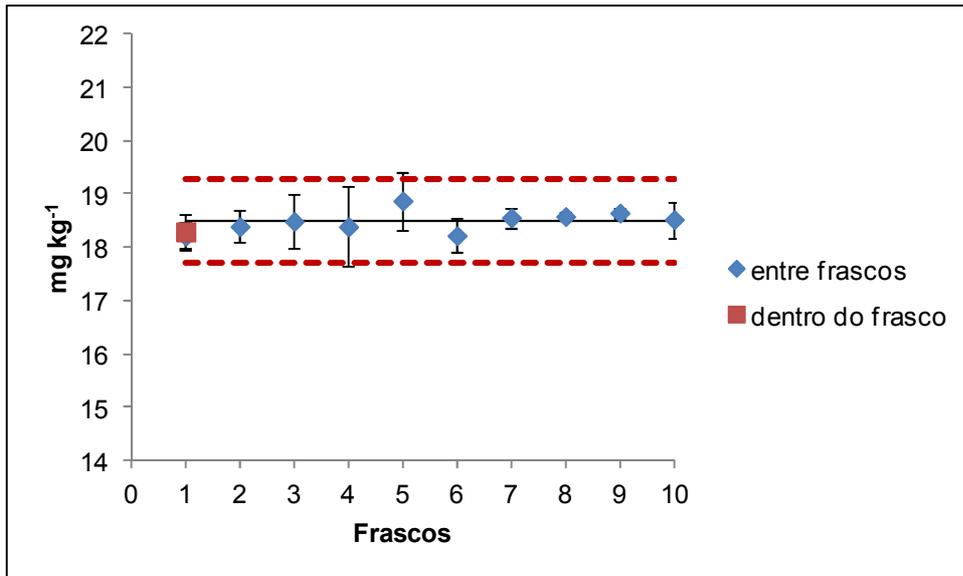


FIGURA 6.5.1 - Homogeneidade entre os frascos e dentro do frasco para cádmio (base úmida).

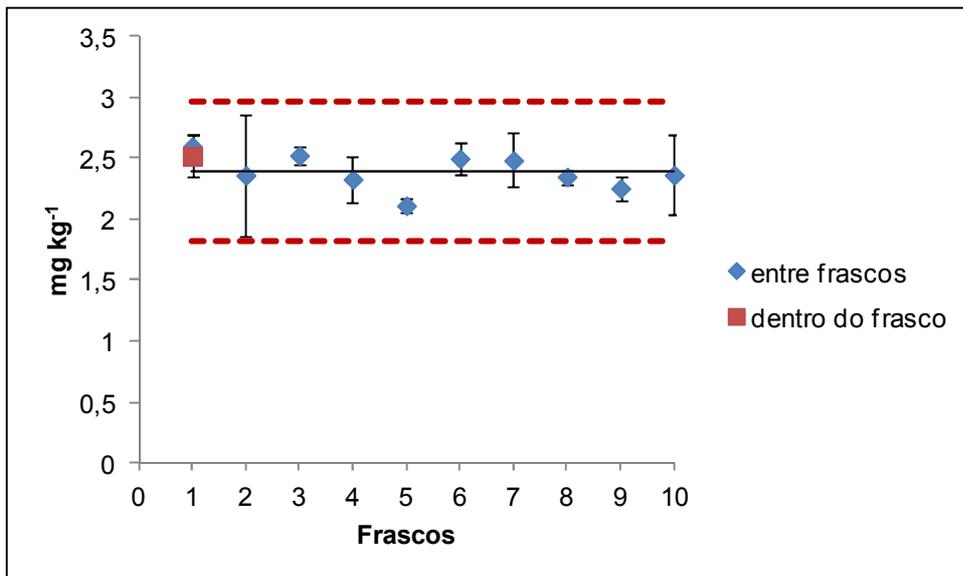


FIGURA 6.5.2 - Homogeneidade entre os frascos e dentro do frasco para cromo (base úmida).

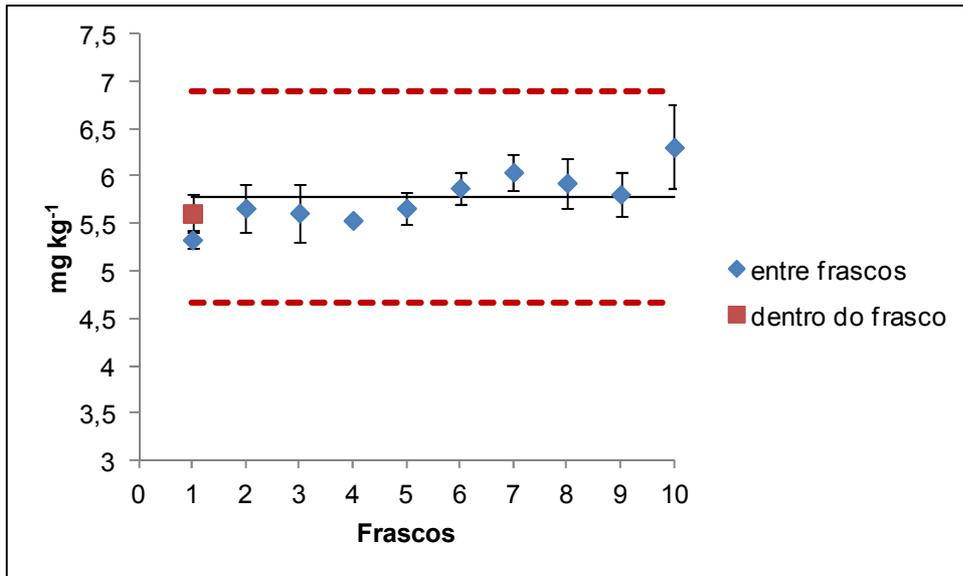


FIGURA 6.5.3 - Homogeneidade entre os frascos e dentro do frasco para chumbo (base úmida).

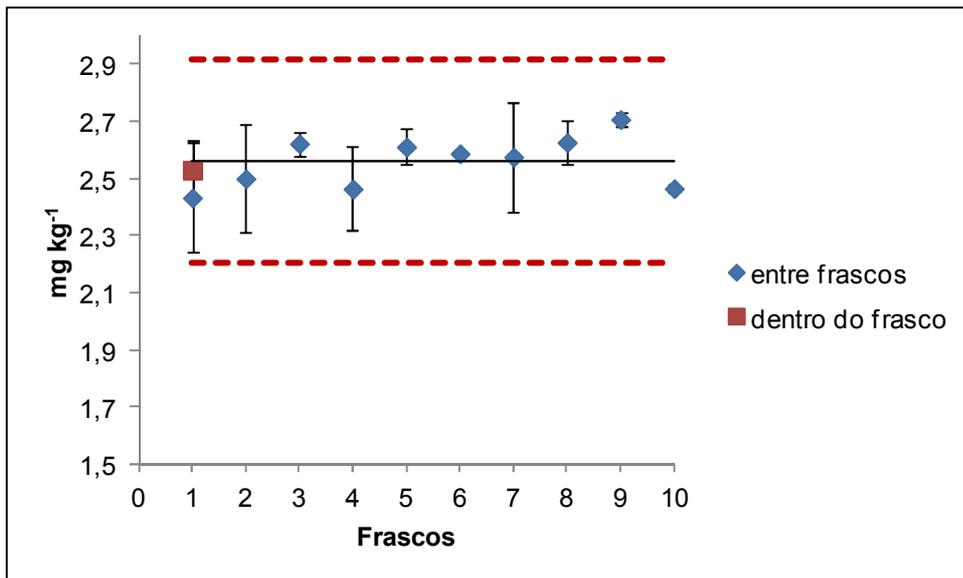


FIGURA 6.5.4. Homogeneidade entre os frascos e dentro do frasco para arsênio (base úmida).

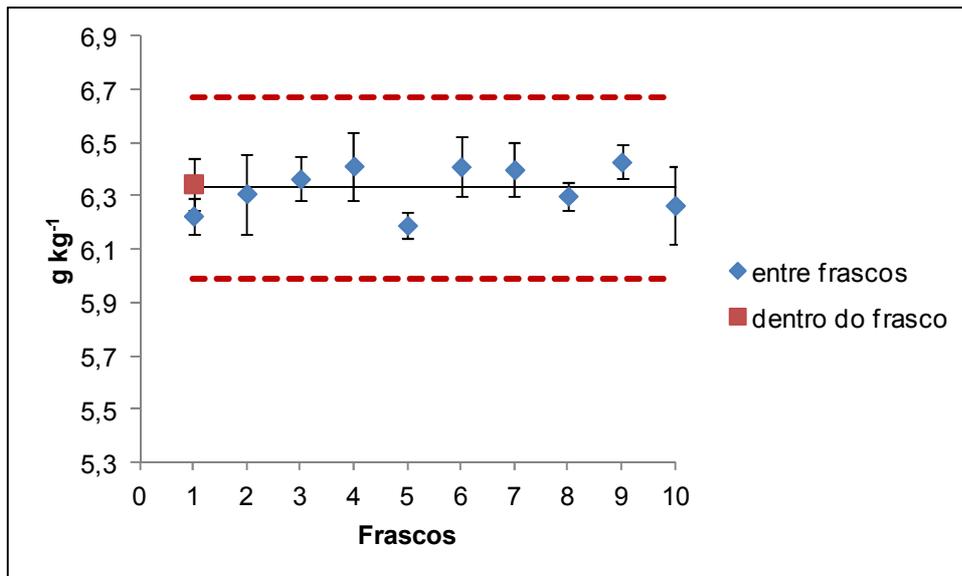


FIGURA 6.5.5 - Homogeneidade entre os frascos e dentro do frasco para cálcio (base úmida).

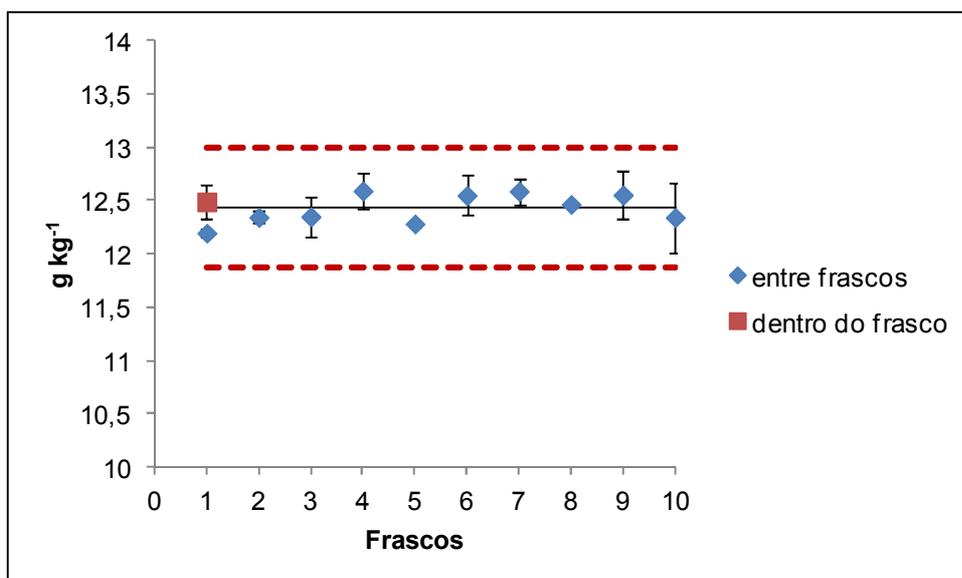


Figura 6.5.6 - Homogeneidade entre os frascos e dentro do frasco para potássio (base úmida).

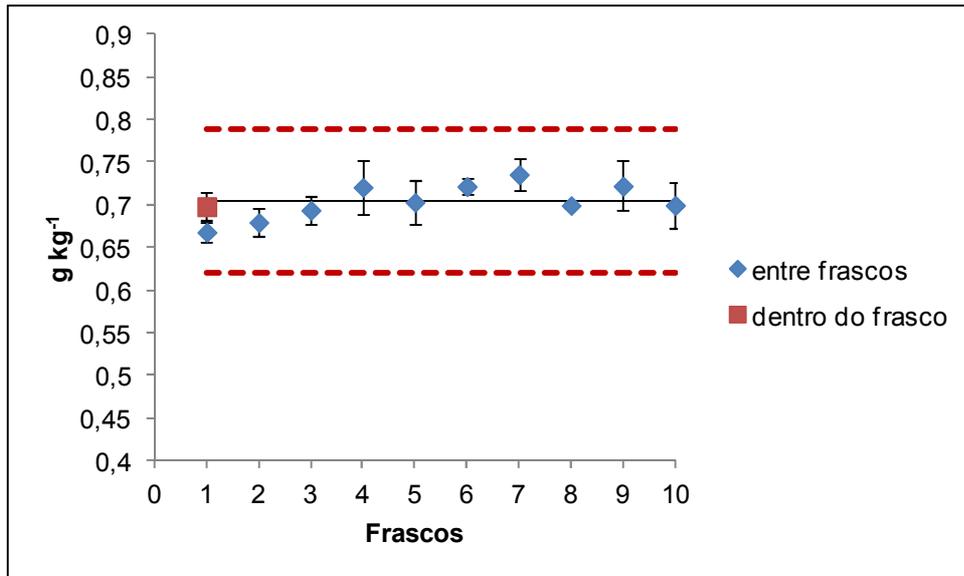


FIGURA 6.5.7 - Homogeneidade entre os frascos e dentro do frasco para fósforo (base úmida).

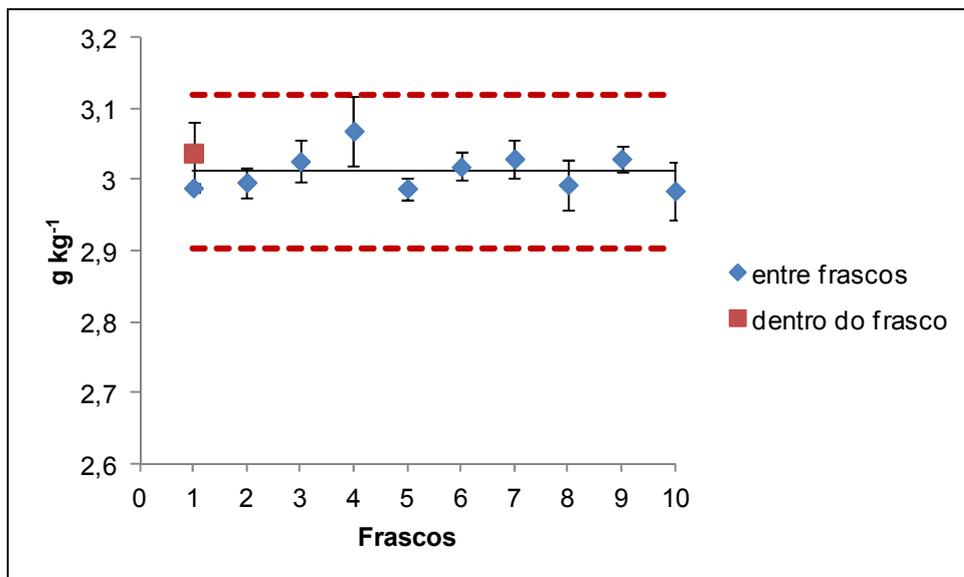


FIGURA 6.5.8 - Homogeneidade entre os frascos e dentro do frasco para magnésio (base úmida).

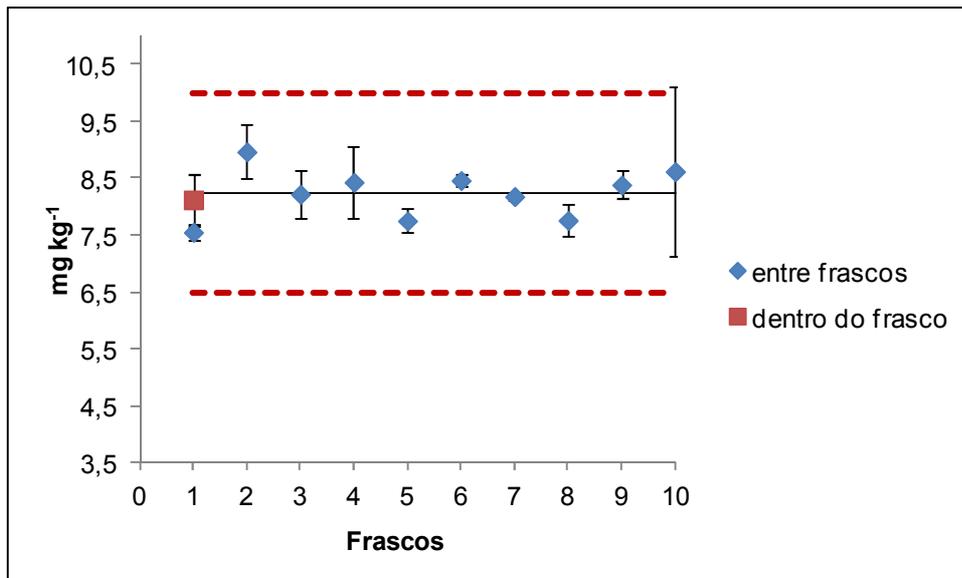


FIGURA 6.5.9 - Homogeneidade entre os frascos e dentro do frasco para zinco (base úmida).

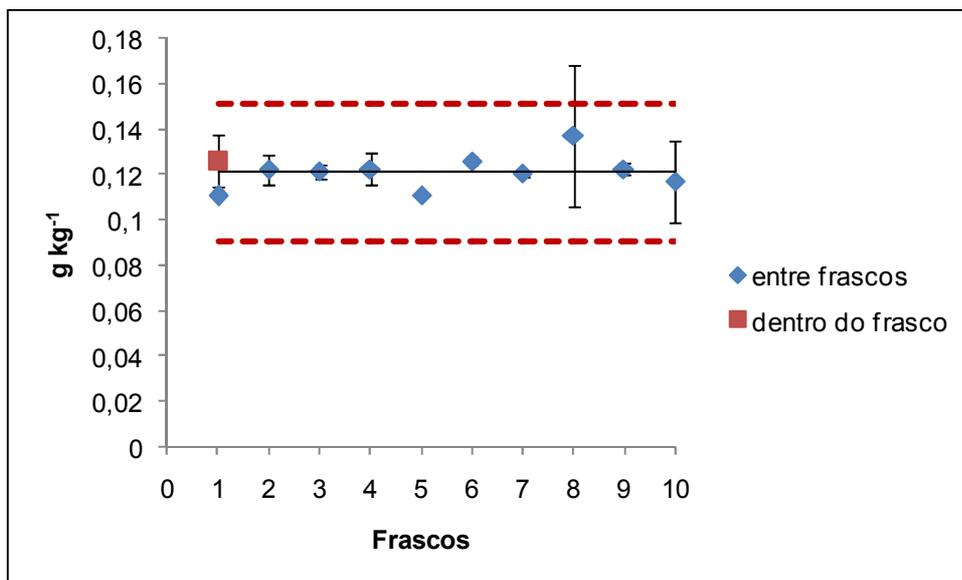


FIGURA 6.5.10 - Homogeneidade entre os frascos e dentro do frasco para sódio (base úmida).

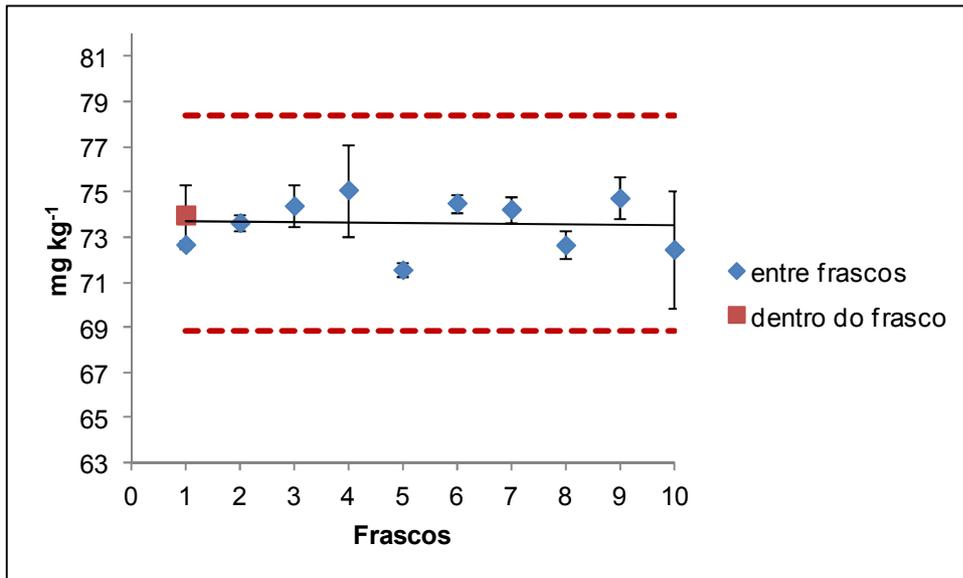


FIGURA 6.5.11 - Homogeneidade entre os frascos e dentro do frasco para manganês (base úmida).

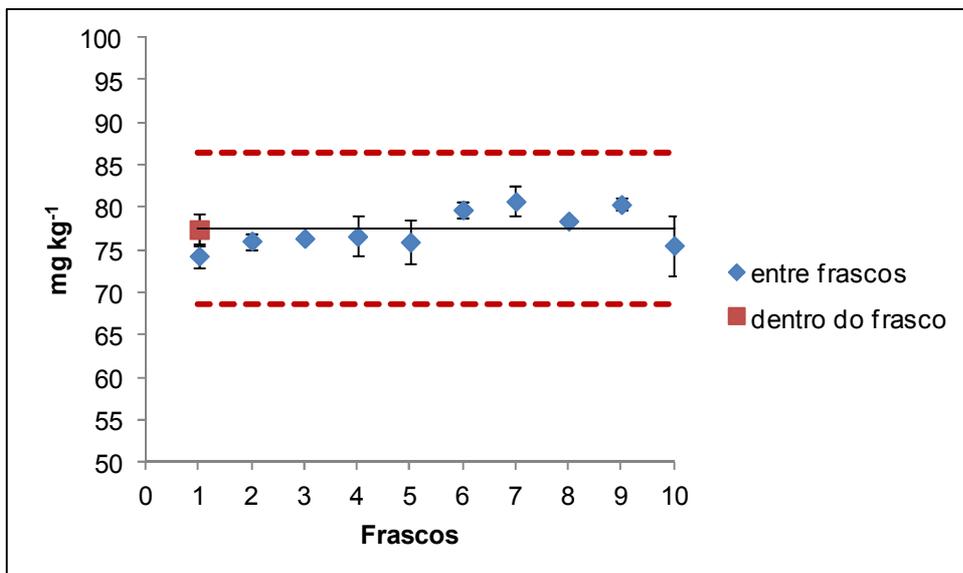


FIGURA 6.5.12 - Homogeneidade entre os frascos e dentro do frasco para ferro (base úmida).

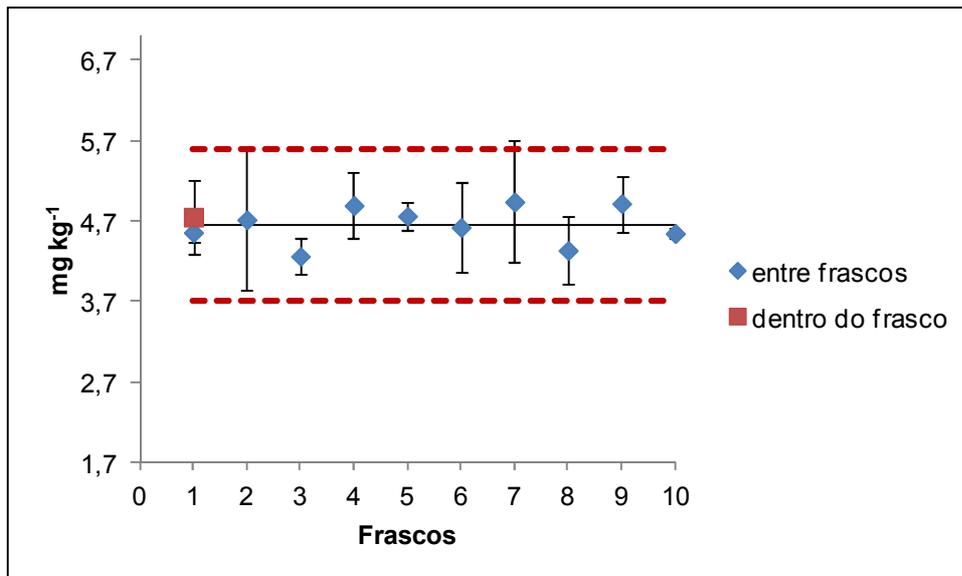


Figura 6.5.13 - Homogeneidade entre os frascos e dentro do frasco para cobre (base úmida).

Na Tabela 6.5.1 estão representados os resultados estatísticos da análise de variância e pôde-se observar que os valores de $F_{crítico}$ foram maiores que os valores de $F_{analítico}$, o que indica que todos os frascos apresentaram valores médios dentro do intervalo de confiança de 95% e que o material tem a sua homogeneidade assegurada para todos os elementos estudados neste trabalho.

Portanto, deve-se considerar que o teste de homogeneidade é uma das etapas mais importantes de um trabalho de desenvolvimento de material de referência, que apesar de trabalhoso, confere confiabilidade de qualidade ao material de referência.

TABELA 6.5.1 - Estatísticas da ANOVA para os valores médios de cada frasco obtidos para o estudo de homogeneidade entre os frascos.

Elemento	Fonte de variação	Média Quadrática	F	F _c ^a
As	entre	0,015881	1,11529	3,020383
	dentro	0,014239		
Ca	entre	0,014388	1,418525	3,020383
	dentro	0,010143		
Cd	entre	0,31579	0,467818	3,020383
	dentro	0,675029		
Cr	entre	0,040918	0,841018	3,020383
	dentro	0,048653		
Cu	entre	0,110837375	0,501474	3,020383
	dentro	0,221023343		
Fe	entre	19,85786	1,865034	3,020383
	dentro	10,64745		
Mn	entre	2,807788692	2,03298	3,020383
	dentro	1,381119817		
Mg	entre	0,001459	1,730021	3,020383
	dentro	0,000843		
Na	entre	0,000115	0,808907	3,020383
	dentro	0,000142		
K	entre	0,000398	1,43123	3,020383
	dentro	0,000278		
P	entre	0,000879	1,957142	3,020383
	dentro	0,000449		
Pb	entre	0,156004	2,617784	3,020383
	dentro	0,059594		
Zn	entre	0,382912	1,179607	3,020383
	dentro	0,32461		

^aF_c para $\alpha = 0,05$

6.5.1 Avaliação da homogeneidade entre frascos através da análise por ativação neutrônica instrumental (INAA)

O princípio básico da análise por ativação neutrônica (NAA) é ser uma técnica de determinação química baseada em reações físicas. Os processos físicos são iniciados com produção de radionuclídeos por meio de reações nucleares geradas a partir das reações com nêutrons. Quando uma amostra é bombardeada com nêutrons, podem ocorrer reações de ativação em núcleos atômicos de diversos elementos, normalmente pela captura de um nêutron. Se o nuclídeo formado for

radioativo, então as propriedades e intensidades da radiação característica emitida a partir do seu decaimento podem ser utilizadas para a determinação do elemento (ELIAS, 2008; TAGLIAFERRO, 2003).

Entre as modalidades de NAA, a mais difundida é a análise por ativação neutrônica instrumental (INAA), que praticamente dispensa o trabalho de preparo de amostras, ficando normalmente restrita à obtenção de um material seco, fino e homogêneo. A ausência de separações químicas e dissolução de amostras tornam o procedimento analítico mais fácil, reduz a possibilidade de contaminação e evita recuperações parciais de elementos. Os princípios físicos envolvidos em NAA são bem conhecidos, todas as suas fontes de incerteza podem ser identificadas e a maioria delas avaliada quantitativamente. A NAA está de acordo com os requerimentos de rastreabilidade formalmente definidos na ISO/IEC 17025 (1999) (BODE et al., 2000; TAGLIAFERRO, 2003).

Em NAA, as condições de irradiação, decaimento e medição e interferência, como radiação de fundo podem influenciar nos valores dos limites de detecção e quantificação. Estes são calculados a partir da estatística de contagem da matriz da amostra. Os limites de detecção e quantificação foram estimados seguindo o método proposto por CURRIE (1999) de acordo com as equações 7, 8 e 9:

$$LD = 3,29\alpha_0 \quad (7)$$

$$LQ = 10 \alpha_0 \quad (8)$$

$$\alpha_0 = \sqrt{RF/t_v} \quad (9)$$

No qual, R_f é o número de contagens da radiação de fundo sob o pico do analito e t_v é o tempo total de medição da amostra (tempo vivo).

Apresentam-se na Tabela 6.5.1.1 os resultados médios obtidos por INAA para os frascos utilizados no teste de homogeneidade entre frascos juntamente com as incertezas-padrão expandidas (U) e os limites de detecção obtidos para cada frasco.

TABELA 6.5.1.1 – Concentrações dos elementos, obtidas por INAA para o estudo da homogeneidade entre frascos, com as incertezas associadas e os valores dos limites de detecção (base úmida).

Elemento	Frascos									
	22	30	32	51	65	110	187	190	325	359
As mg/kg	1,62±0,4	1,7±0,2	1,64±0,1	1,57±0,1	1,58±0,1	1,61±0,1	1,59±0,1	1,58±0,1	1,62±0,1	1,61±0,1
U (%)	5,60	5,60	5,80	6,60	6,60	5,80	7,80	8,60	9,00	6,80
LD mg/kg	0,08	0,08	0,08	0,09	0,09	0,08	0,09	0,07	0,06	0,05
Ca g/kg	4,5±0,15	4,3±0,1	4,5±0,13	4,5±0,1	4,35±0,2	4,3±0,16	4,31±0,1	4,3±0,08	4,4±0,08	4,45±0,1
U (%)	7,80	8,60	7,80	8,80	9,20	7,40	8,20	9,00	7,20	6,60
LD mg/kg	147,00	148,00	137,00	184,00	207,00	143,00	180,00	138,00	177,00	137,00
Cd mg/kg	19,6±0,2	20±0,4	19,6±0,7	19,7±0,1	19,4±0,3	19,3±0,6	19,2±0,2	19,0±0,4	19,5±0,2	19,2±0,5
U (%)	7,60	7,20	7,40	7,80	7,60	7,60	7,60	8,40	7,60	7,80
LD mg/kg	0,93	0,92	0,66	0,88	1,12	0,69	0,97	0,42	0,47	0,39
Cr mg/kg	3,70±0,2	3,8±0,2	3,63±0,1	3,84±0,3	3,77±0,5	3,56±0,2	4,11±0,9	3,51±0,1	3,61±0,1	3,57±0,1
U (%)	12,20	12,47	12,73	12,66	11,11	12,57	12,59	12,98	16,36	13,01
LD mg/kg	0,47	0,48	0,48	0,47	0,47	0,48	0,47	0,48	0,66	0,47
Fe mg/kg	90,5±4,3	87,2±4	87,8±1,6	87,4±2,6	87,4±4,6	86,3±1,6	89,0±3,5	85,8±1,0	84,6±2,2	86,9±1,2
U (%)	4,40	4,20	4,60	4,80	5,00	4,40	4,60	4,62	4,64	4,22
LD mg/kg	2,30	2,44	2,50	3,43	3,43	2,54	3,08	2,76	3,46	2,62
K g/kg	11±0,2	11±0,2	11,2±0,1	11,2±0,2	11±0,12	11±0,2	11±0,2	10,9±0,1	11,0±0,1	11±0,2
U (%)	5,20	5,00	5,00	4,40	4,60	4,60	4,40	3,40	3,40	2,80
LD mg/kg	36,80	38,80	40,00	42,40	44,00	34,60	40,30	55,10	69,50	54,60
Na mg/kg	117±2	115±4	114±2	116,7±1	115±2,3	116±5,2	115±1,2	114±1,9	112±5,1	111±1,7
U (%)	4,63	4,02	3,82	3,62	3,82	4,43	3,42	3,02	3,44	3,02
LD mg/kg	0,52	0,53	0,54	0,62	0,65	0,50	0,60	0,77	0,92	0,74
Zn mg/kg	10,1±0,7	9,6±0,1	9,5±0,3	9,4±0,2	9,4±0,1	9,3±0,2	9,3±0,2	9,3±0,2	9,4±0,2	9,3±0,2
U (%)	5,00	5,60	5,00	5,40	5,40	5,00	5,80	5,00	5,00	5,00
LD mg/kg	0,15	0,15	0,16	0,20	0,19	0,15	0,18	0,19	0,22	0,18

O valor da incerteza final obtida na Tabela 6.5.1.1 está relacionado com a contribuição das incertezas individuais da pesagem, fluxo de nêutrons, estatística de contagem, geometria de contagem, correção de auto-atenuação da radiação gama e padronização das constantes (TAGLIAFERRO, 2003).

Na Tabela 6.5.1.2 estão representados os resultados estatísticos da análise de variância e pôde-se observar que os valores de $F_{crítico}$ foram maiores que os valores de $F_{analítico}$. Assim, todos os frascos apresentaram valores médios dentro do intervalo de confiança de 95%, assegurando, novamente a homogeneidade do material candidato a material de referência.

Os elementos Ba, Br, Cs, La, Rb e Sr também foram determinados, mas somente foram apresentados os elementos de interesse neste trabalho. A INAA foi realizada para fins de se garantir a homogeneidade e a caracterização para fins de comparação de resultados e cálculos das incertezas, juntamente com os resultados obtidos na participação de outros laboratórios.

TABELA 6.5.1.2. Estatísticas da ANOVA para os valores médios de cada frasco obtidos por INAA para o estudo de homogeneidade entre os frascos.

Elemento	Fonte de variação	Média Quadrática	F	F_c^a
As	entre	0,004387	1,109612	2,392814
	dentro	0,003953		
Ca	entre	5363,333	0,296153	2,392814
	dentro	18110		
Cd	entre	0,135148	0,841171	2,392814
	dentro	0,160667		
Cr	entre	0,116722	0,918145	2,392814
	dentro	0,127128		
Fe	entre	2,464502	0,246496	2,392814
	dentro	9,998151		
Na	entre	9,898382	1,323455	2,392814
	dentro	7,479197		
K	entre	7407,407	0,267738	2,392814
	dentro	27666,67		
Zn	entre	0,047459	1,519993	2,392814
	dentro	0,031223		

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

6.6 - Estudo de estabilidade do candidato a material de referência

6.6.1 - Estudo de estabilidade a curto prazo

A seguir são apresentadas as Figuras 6.6.1.1 a 6.6.1.13 que representam os resultados referentes às réplicas de cada frasco em estudo, juntamente com o frasco controle para As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Pb e Zn.

Foi realizada análise de variância ANOVA de fator único e o $F_{analítico}$ foi comparado ao $F_{crítico}$.

Ao se verificar os valores estatísticos da ANOVA para os valores médios e as respectivas dispersões obtidas dos frascos armazenados a temperatura de 38 °C e umidade relativa de 100%, em relação a temperatura controle (25 °C),

pôde-se observar que o $F_{crítico}$ foi maior que $F_{analítico}$, comprovando que todos os frascos apresentaram médias dentro do intervalo de confiança de 95%. Portanto, não houve diferenças significativas entre as médias obtidas para os frascos, independentemente da temperatura e do tempo de exposição a esta.

Cabe destacar que mesmo que As, Cd e Pb possam ser instáveis em materiais de referência devido a possível degradação ou perdas por volatilização (GREENBERG, 2005), não foram observadas alterações significativas durante o período do teste.

Os resultados aqui apresentados referem-se a análises realizadas após um mês de armazenamento dos frascos. Os mesmos foram também analisados após dois meses de armazenamento, conforme o procedimento realizado por MOREIRA et al (2009) e novamente não foram observadas quaisquer alterações significativas na concentração de As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Pb e Zn.

Na Tabela 6.6.1.1 estão representados os resultados estatísticos da análise de variância e os valores de $F_{crítico}$ foram maiores que os valores de $F_{analítico}$, para As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Pb e Zn.

Isso demonstra que todos os frascos apresentaram valores médios dentro do intervalo de confiança de 95% e, portanto, deve-se considerar que o material candidato a material de referência é estável o suficiente para ser transportado sem alterações significativas na composição química do material.

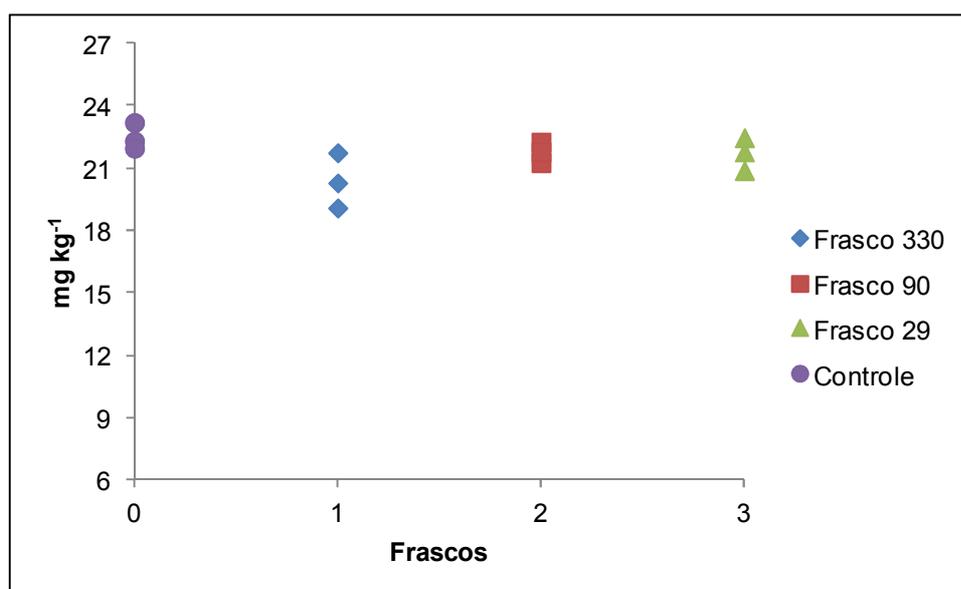


FIGURA 6.6.1.1 - Estabilidade a curto prazo para cádmio (base úmida).

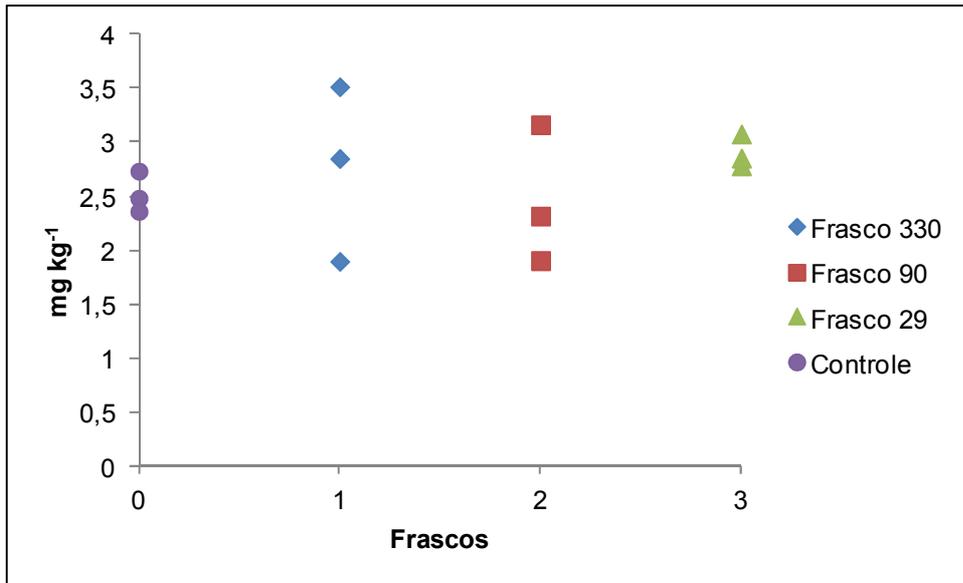


FIGURA 6.6.1.2 - Estabilidade a curto prazo para cromo (base úmida).

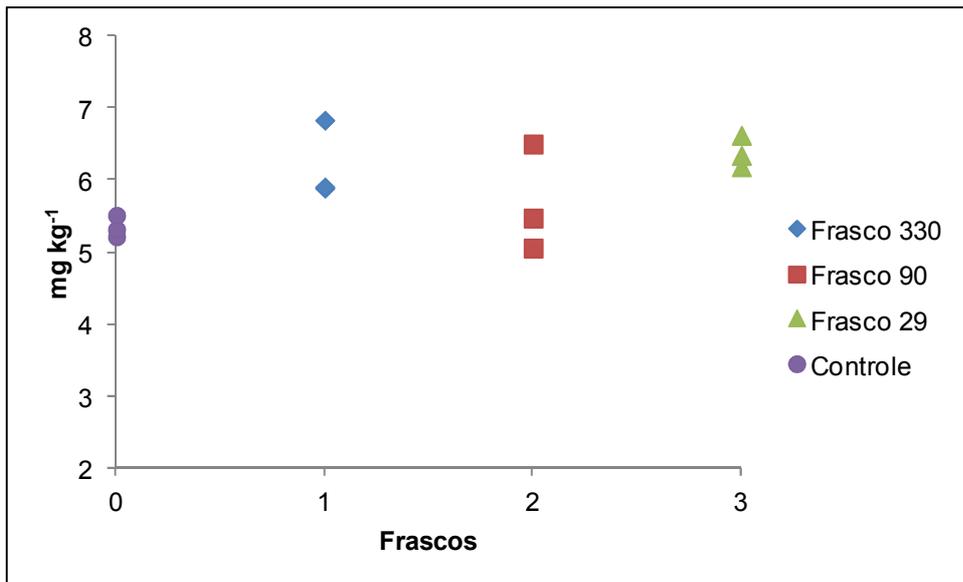


FIGURA 6.6.1.3 - Estabilidade a curto prazo para chumbo (base úmida).

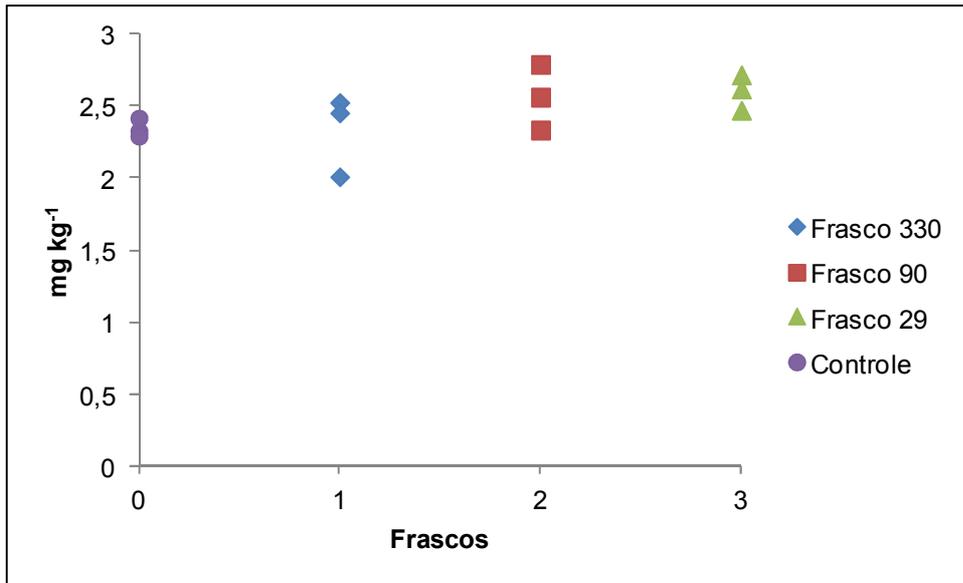


FIGURA 6.6.1.4 - Estabilidade a curto prazo para arsênio (base úmida).

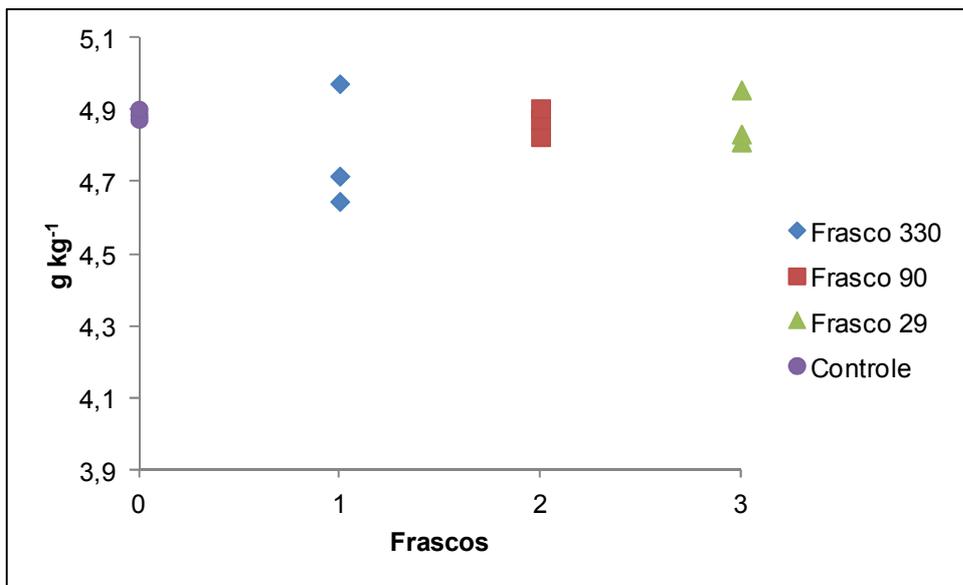


FIGURA 6.6.1.5 - Estabilidade a curto prazo para cálcio (base úmida).

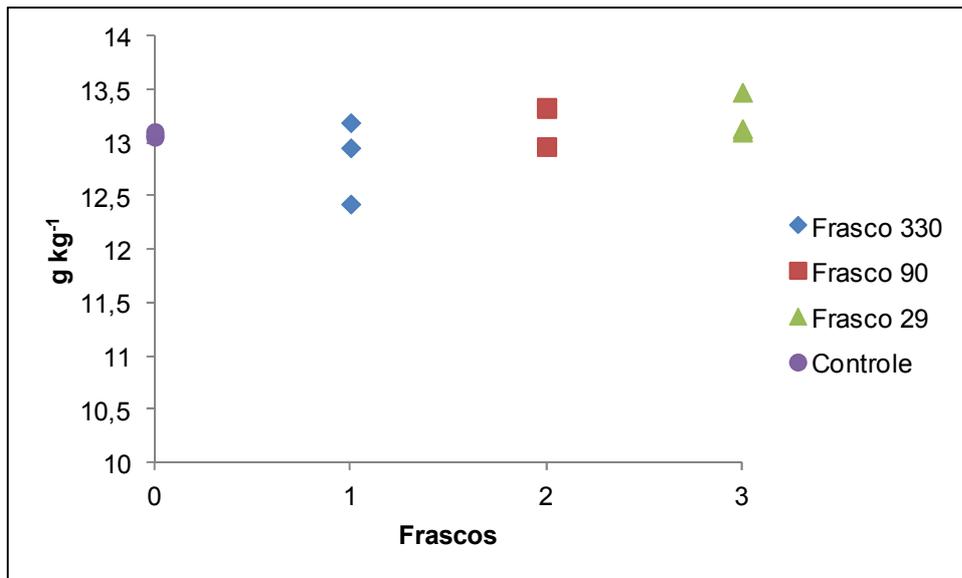


FIGURA 6.6.1.6 - Estabilidade a curto prazo para potássio (base úmida).

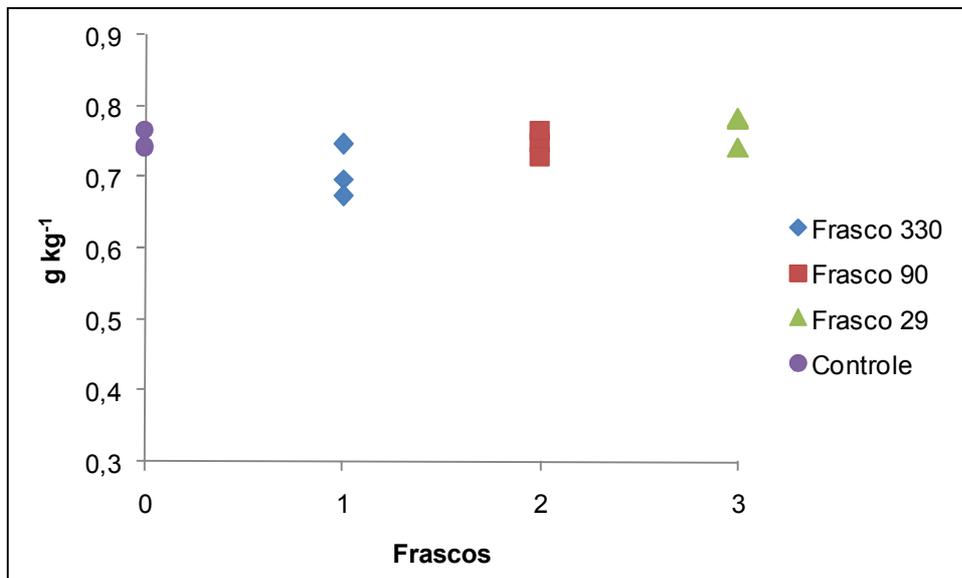


FIGURA 6.6.1.7 - Estabilidade a curto prazo para fósforo (base úmida).

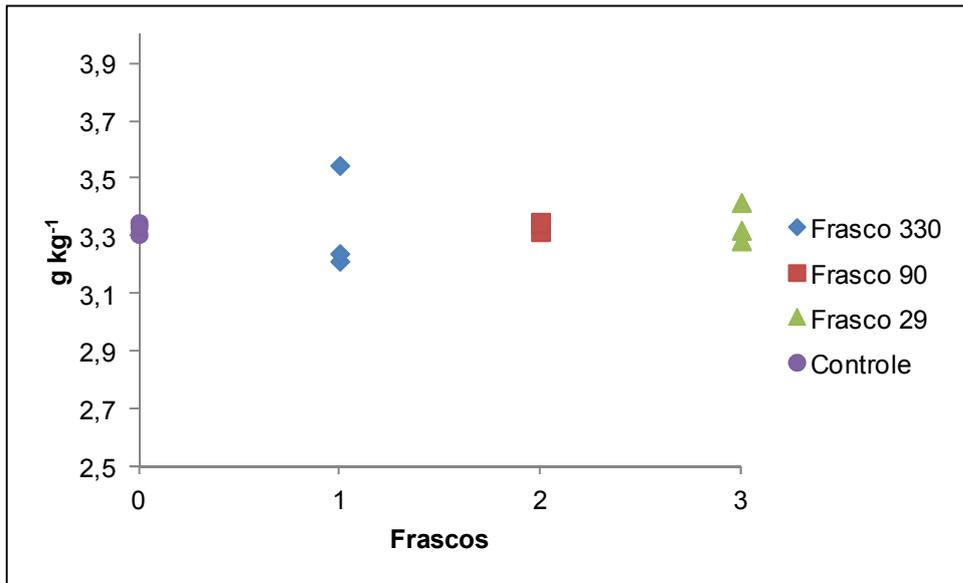


FIGURA 6.6.1.8 - Estabilidade a curto prazo para magnésio (base úmida).

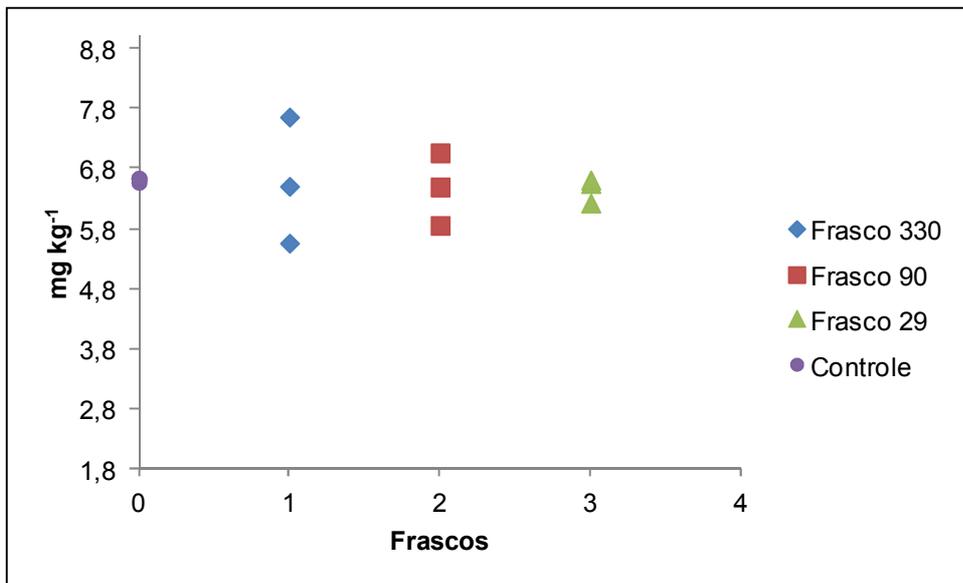


FIGURA 6.6.1.9 - Estabilidade a curto prazo para zinco (base úmida).

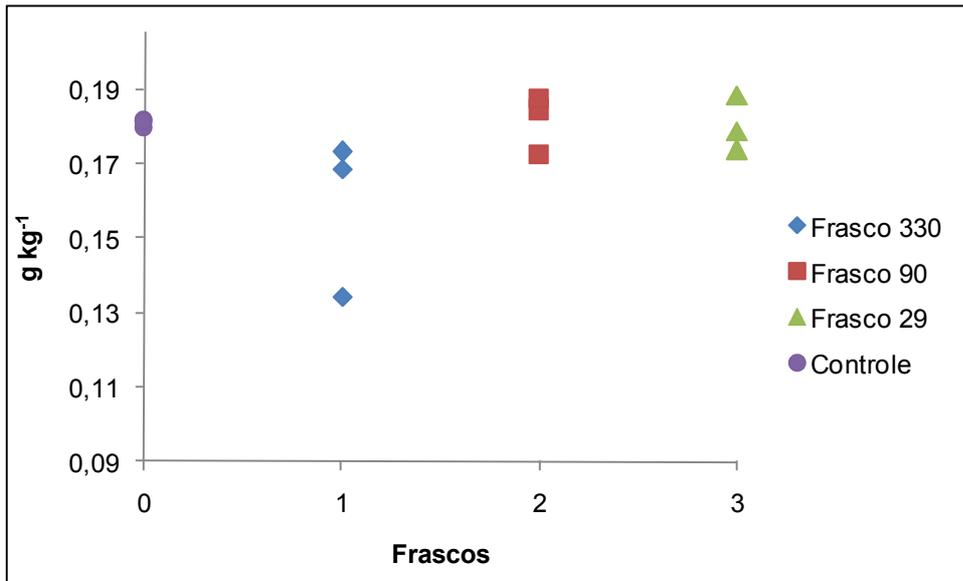


FIGURA 6.6.1.10 - Estabilidade a curto prazo para sódio (base úmida).

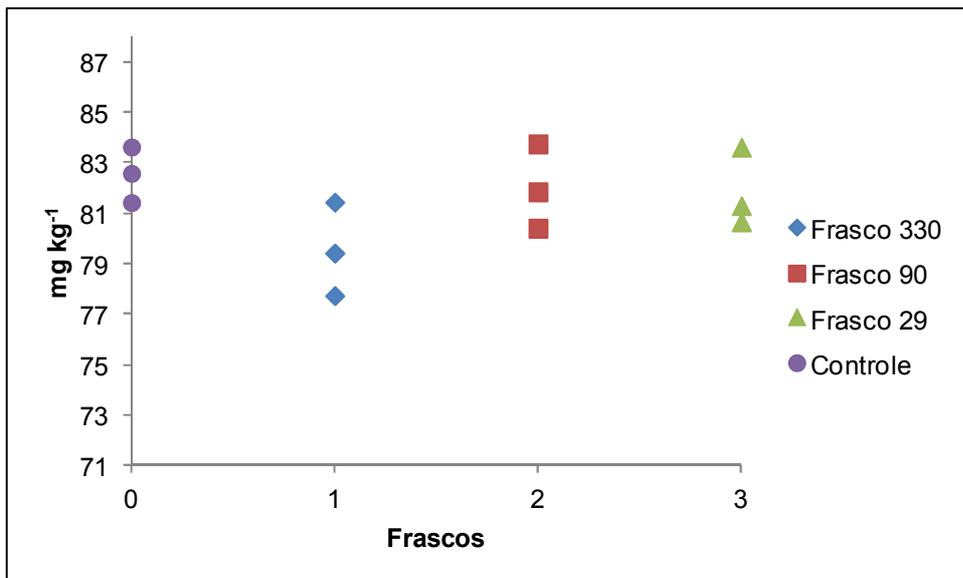


FIGURA 6.6.1.11 - Estabilidade a curto prazo para manganês (base úmida).

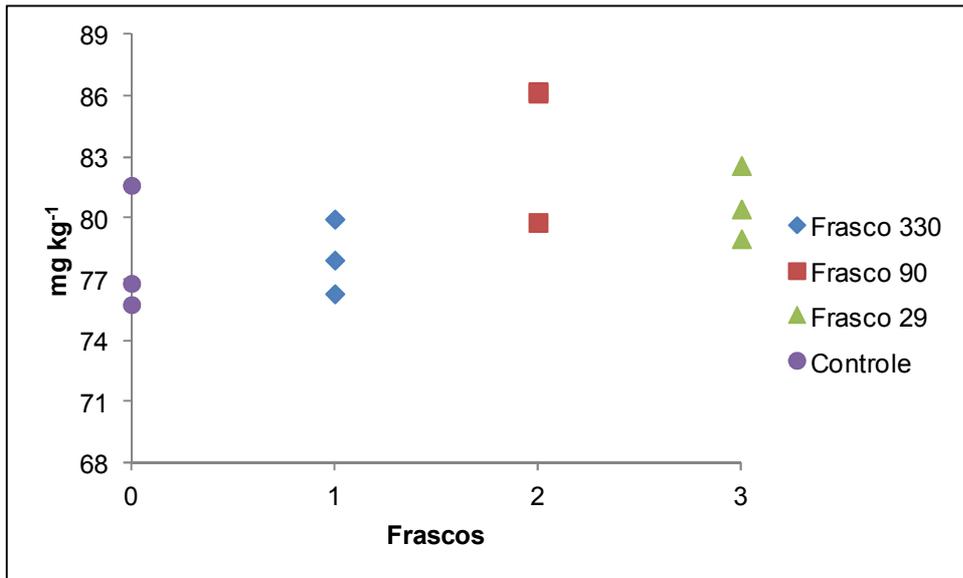


FIGURA 6.6.1.12 - Estabilidade a curto prazo para ferro (base úmida).

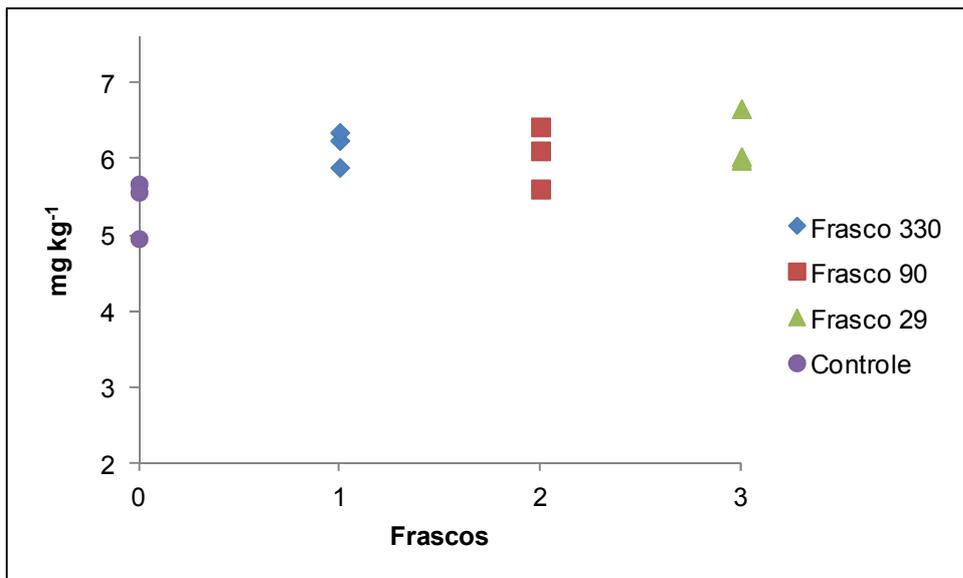


FIGURA 6.6.1.13 - Estabilidade a curto prazo para cobre (base úmida).

TABELA 6.6.1.1 - Estatísticas da ANOVA para os valores médios de cada frasco armazenado a 38 °C e 100% de umidade relativa em comparação com o frasco controle, obtidos por ICP-MS e ICP OES para o estudo de estabilidade a curto prazo.

Elemento	Fonte de variação	Média Quadrática	F	F _c ^a
As	entre	0,060853	1,632767	4,066181
	dentro	0,03727		
Ca	entre	7107,007	0,762124	4,066181
	dentro	9325,258		
Cd	entre	2,32675	3,060162	4,066181
	dentro	0,760335		
Cr	entre	0,125662	0,445295	4,066181
	dentro	0,2822		
Cu	entre	0,433317	3,343655	4,066181
	dentro	0,129594		
Fe	entre	24,07192	3,224078	4,066181
	dentro	7,466296		
Mn	entre	5,35134	2,166016	4,066181
	dentro	2,470591		
Mg	entre	71,23757	0,007208	4,066181
	dentro	9882,557		
Na	entre	367,629	2,607901	4,066181
	dentro	140,9674		
K	entre	0,089487	1,491633	4,066181
	dentro	0,059993		
P	entre	2103,222	3,424983	4,066181
	dentro	614,0824		
Pb	entre	0,682071	2,985992	4,066181
	dentro	0,228424		
Zn	entre	0,017772	0,046925	4,066181
	dentro	0,378745		

^aF_c para α = 0,05

6.6.2 - Estudo da estabilidade a longo prazo

A validade de um material de referência é estabelecida como garantia de estocagem. Cabe ao usuário adotar práticas que assegurem a qualidade do produto para sua utilização após aberta a embalagem (CHUI et al., 2005). Nos laboratórios, geralmente recomenda-se a manutenção de gráficos de controle para o

acompanhamento da estabilidade do produto até seu esgotamento para que exista confiabilidade dos seus resultados e garantia da qualidade analítica (ABNT, 2001).

A seguir são apresentadas as Figuras 6.6.2.1 a 6.6.2.13 que indicam os resultados referentes às réplicas de cada frasco em estudo para As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Pb e Zn ao longo dos 9 meses de estudo.

Foi utilizada a análise de variância ANOVA de fator único como ferramenta estatística e o $F_{crítico}$ foi comparado ao $F_{analítico}$.

Ao se verificar os valores estatísticos da ANOVA para os valores médios e as respectivas dispersões obtidas dos frascos armazenados a temperatura de 38 °C e umidade relativa de 100% em relação a temperatura controle (25 °C) pôde-se observar que o $F_{crítico} > F_{analítico}$,

Na Tabela 6.6.2.1 são mostrados os resultados estatísticos da análise de variância e os valores de $F_{crítico}$ foram maiores que os valores de $F_{analítico}$ para As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Pb e Zn, comprovando, assim, que todos os frascos apresentaram médias dentro do intervalo de confiança de 95%.

Com a aplicação do método de preparo de amostra e a determinação dos contaminantes por ICP-MS e dos macro e micronutrientes, essenciais para a forrageira e nutrição animal, por ICP OES ao estudo de estabilidade a longo prazo, foi possível confirmar que não houve diferenças significativas nas concentrações dos treze elementos estudados.

Concluiu-se, então, que a amostra candidata a material de referência de forrageira é suficientemente estável para ser armazenada a temperatura ambiente, sem alterações significativas na composição dos elementos estudados neste trabalho.

No estudo de estabilidade a longo prazo, as análises ocorreram durante o período de 9 meses a temperatura ambiente (cerca de 25 °C) a partir do envase do material, e estas devem ser realizadas até que se complete um ano. Após esse período, o teste deverá ser repetido após 6 meses.

Estipulou-se que o tempo de prateleira poderia ser em torno de 5 anos para o candidato a material de referência de forrageira, conforme encontrado nos diversos materiais de referência certificados pelo NIST para folhas. Existe a necessidade de se ter um prazo de validade para limitar a influência na incerteza da estabilidade do material na incerteza combinada de certificação. É possível que o material seja estável por tempo maior que o definido. Dessa forma, este material

ficará como produto a ser monitorado semestralmente, até expirar o prazo de validade do material.

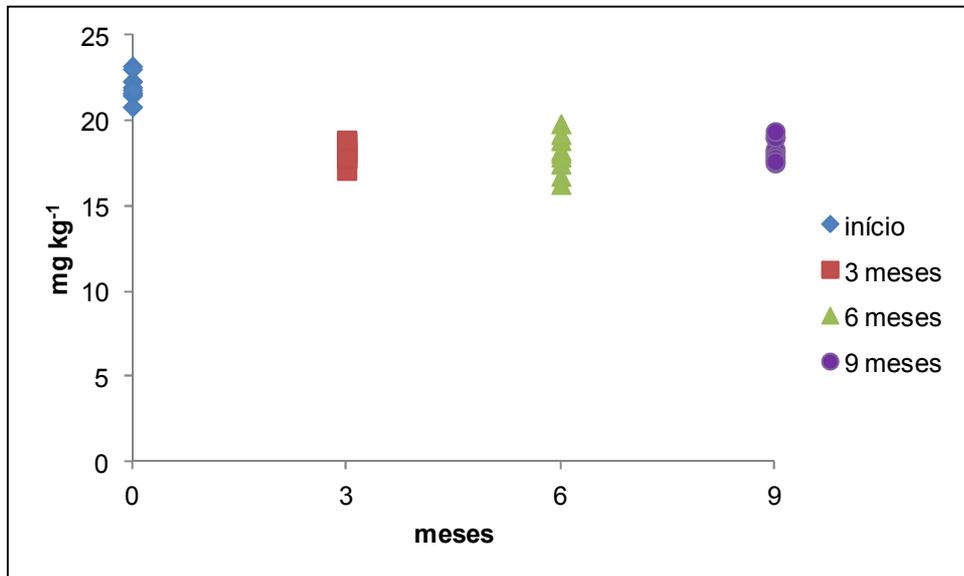


FIGURA 6.6.2.1 - Estabilidade a longo prazo para cádmio (base úmida)

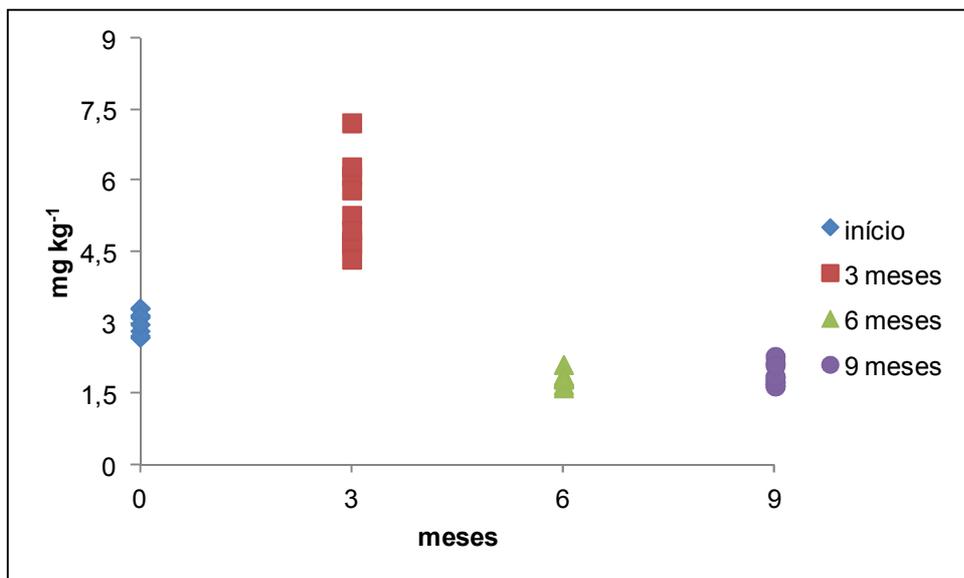


FIGURA 6.6.2.2 - Estabilidade a longo prazo para cromo (base úmida).

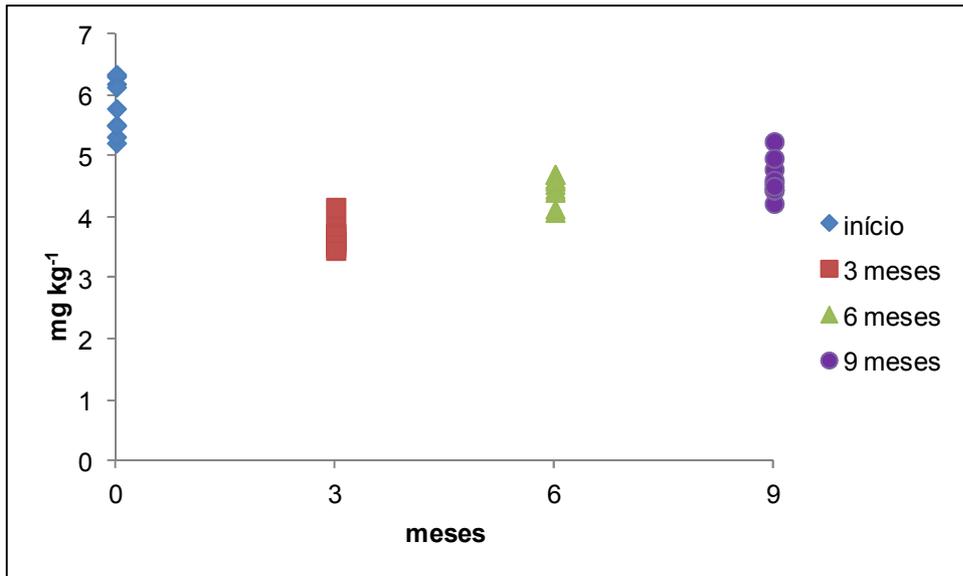


FIGURA 6.6.2.3 - Estabilidade a longo prazo para chumbo (base úmida).

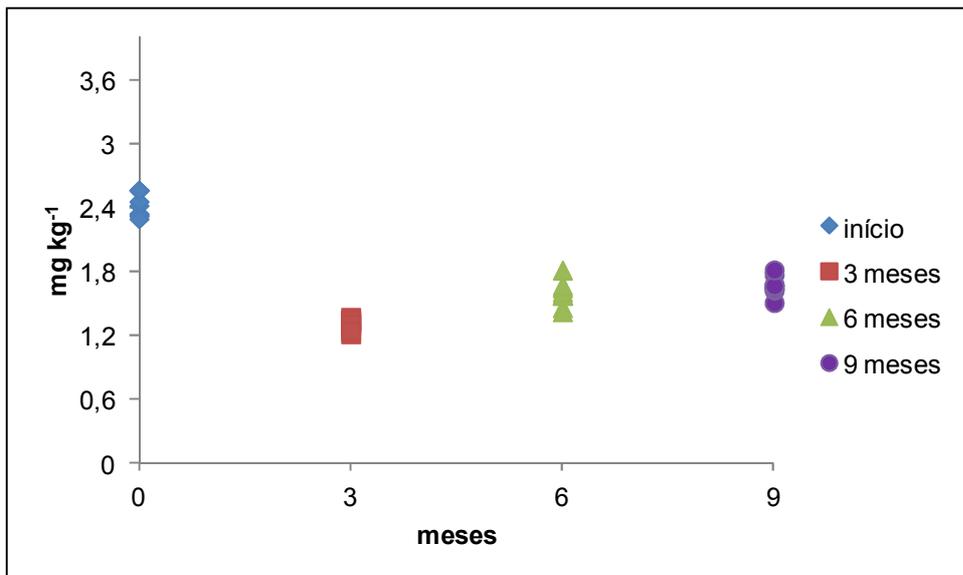


FIGURA 6.6.2.4 - Estabilidade a longo prazo para arsênio (base úmida).

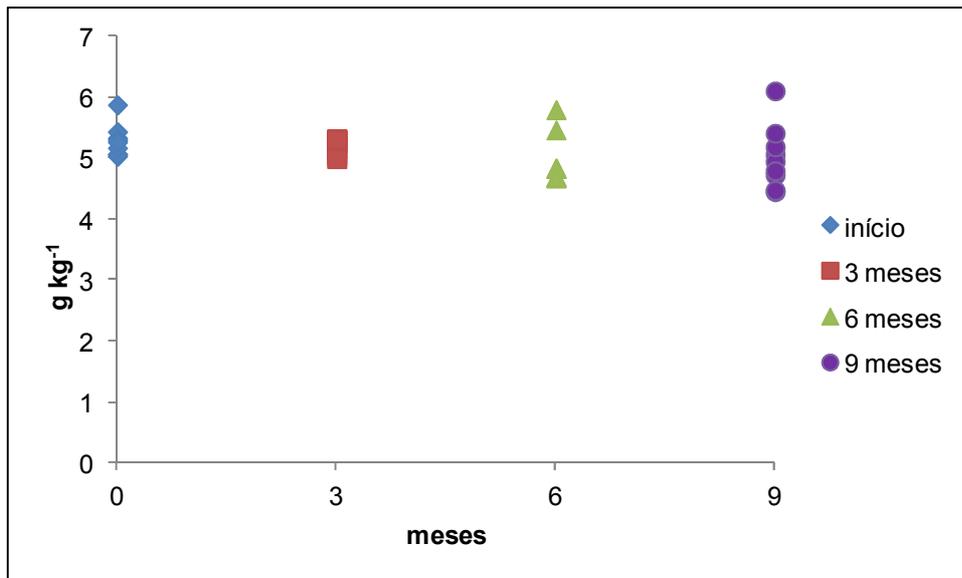


FIGURA 6.6.2.5 - Estabilidade a longo prazo para cálcio (base úmida).

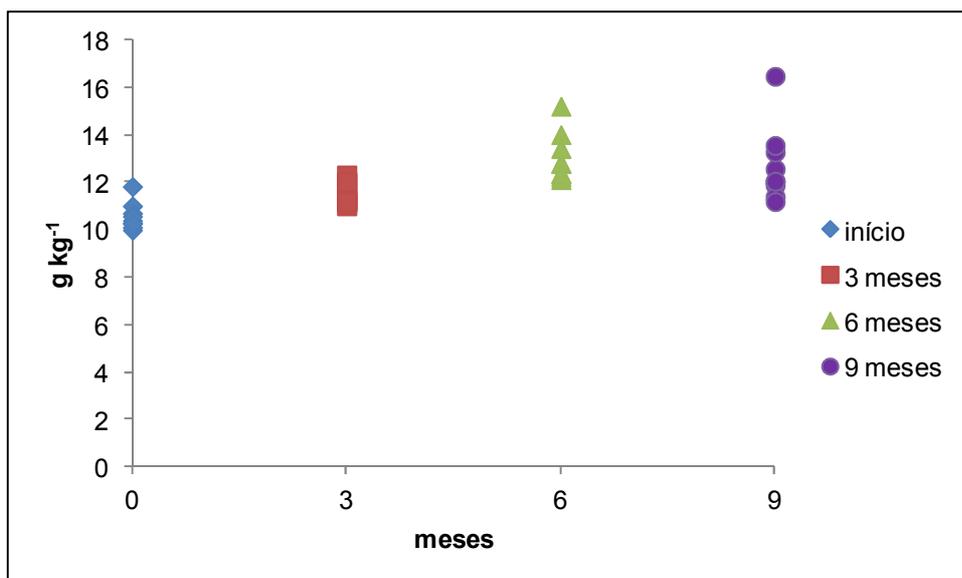


FIGURA 6.6.2.6 - Estabilidade a longo prazo para potássio (base úmida).

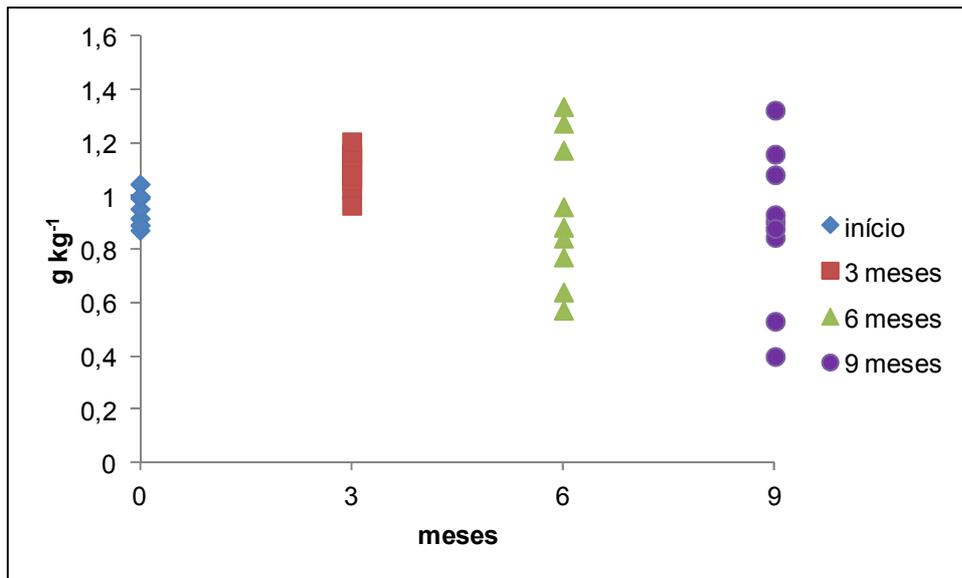


FIGURA 6.6.2.7 - Estabilidade a longo prazo para fósforo (base úmida).

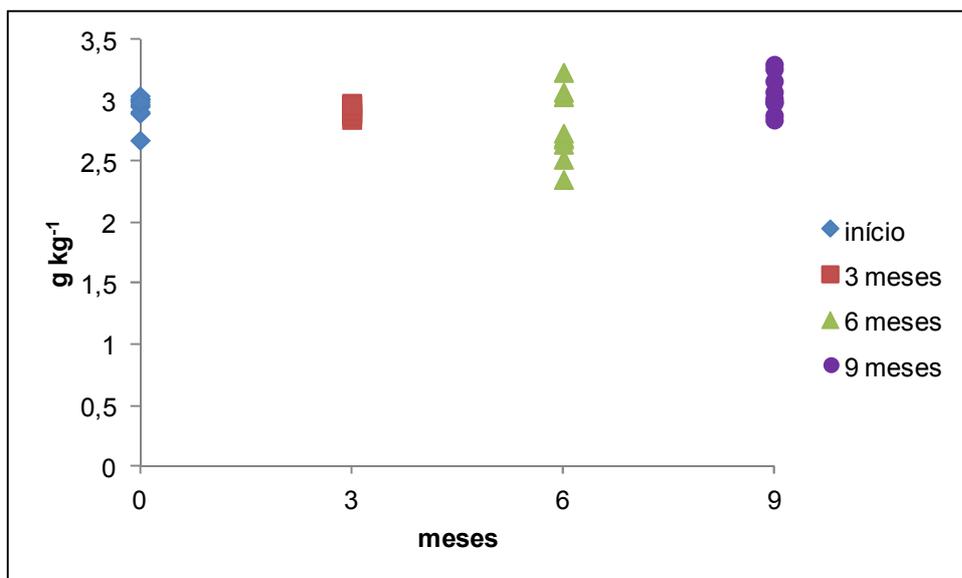


FIGURA 6.6.2.8 - Estabilidade a longo prazo para magnésio (base úmida).

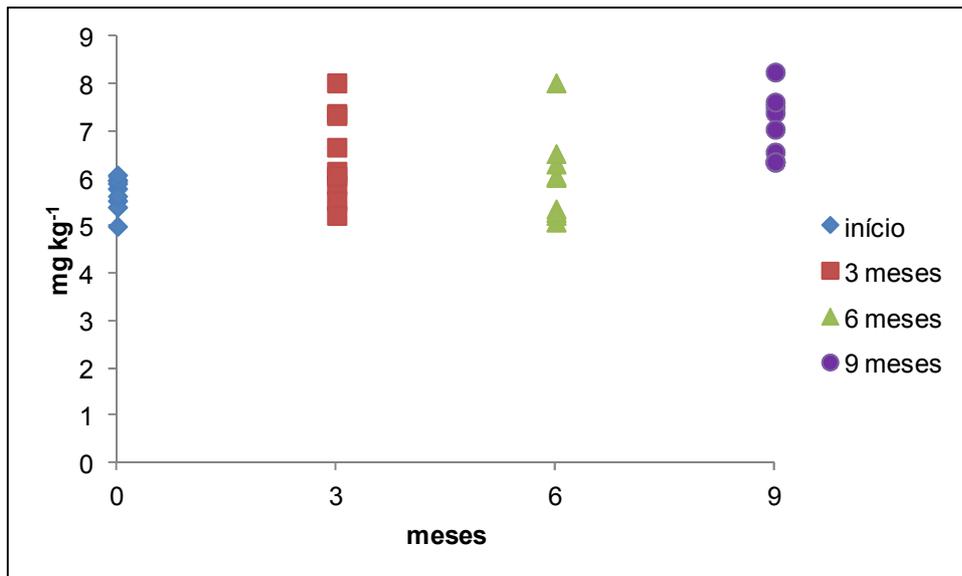


FIGURA 6.6.2.9 - Estabilidade a longo prazo para zinco (base úmida).

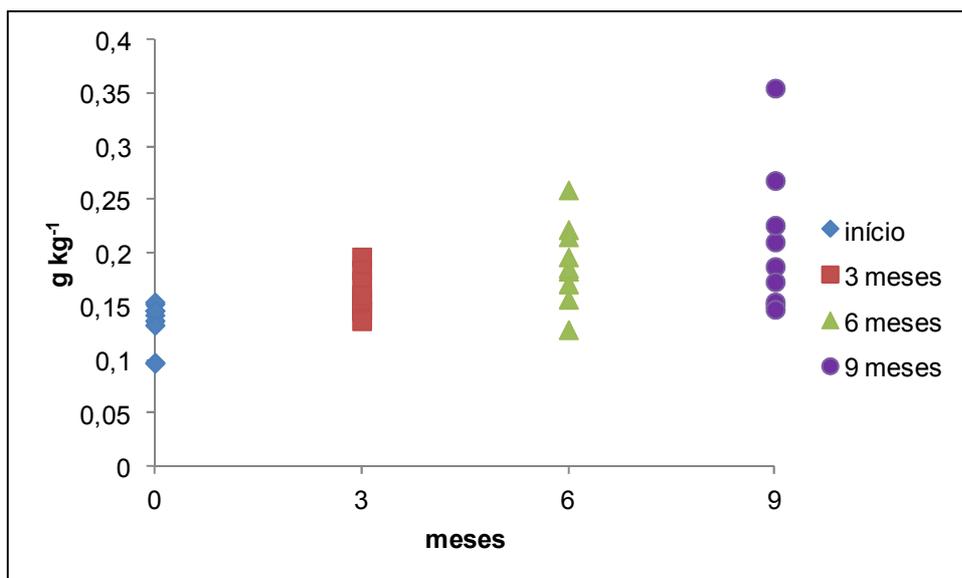


FIGURA 6.6.2.10 - Estabilidade a longo prazo para sódio (base úmida).

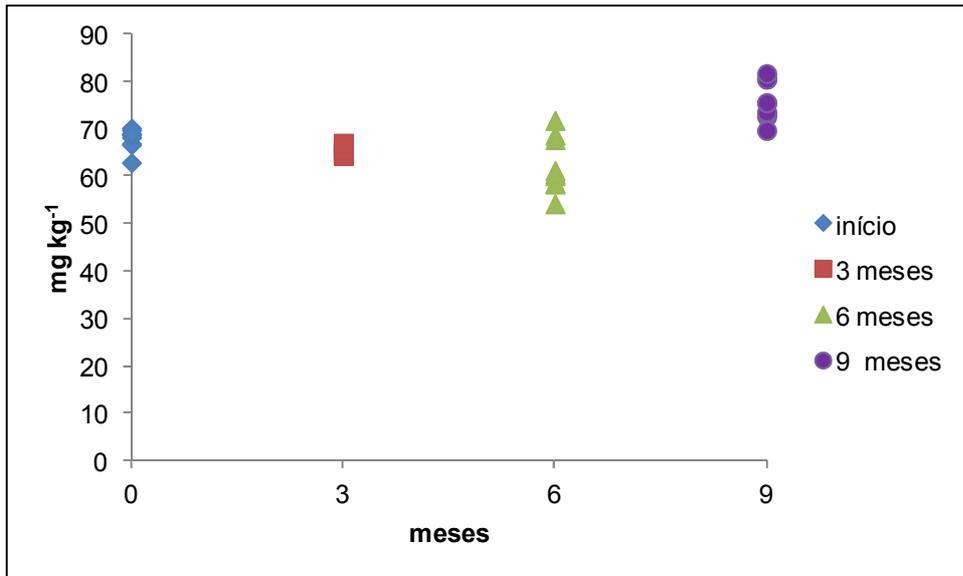


FIGURA 6.6.2.11 - Estabilidade a longo prazo para manganês (base úmida).

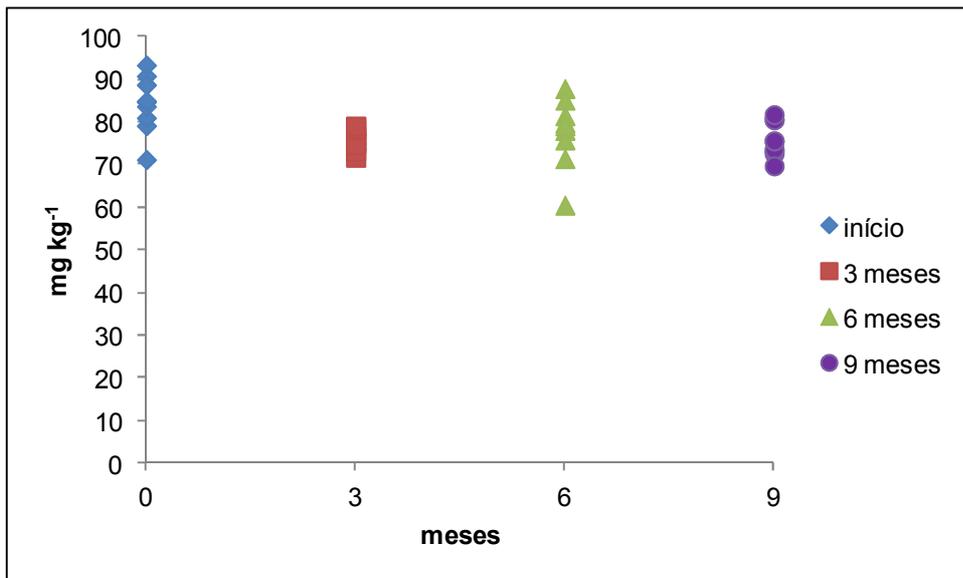


FIGURA 6.6.2.12 - Estabilidade a longo prazo para ferro (base úmida).

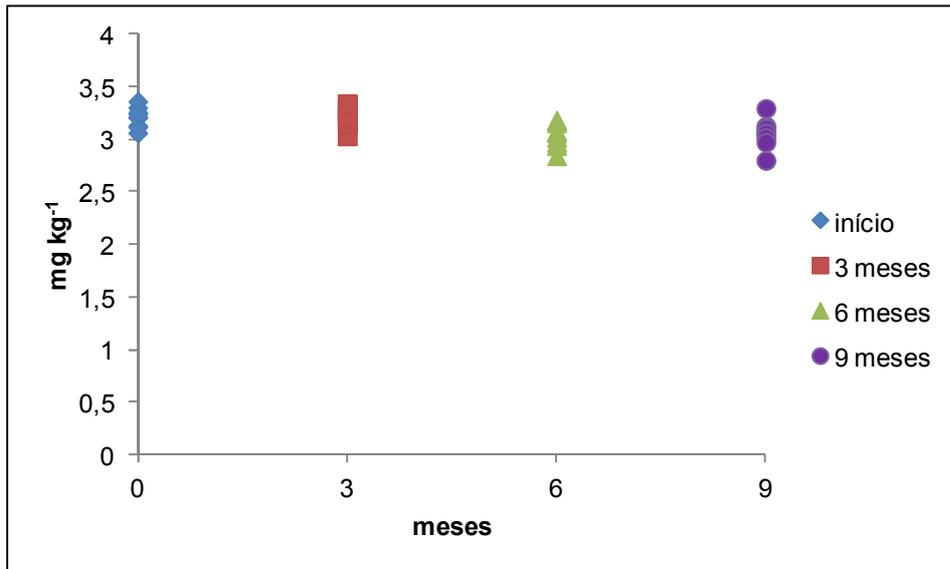


FIGURA 6.6.2.13 - Estabilidade a longo prazo para cobre (base úmida).

TABELA 6.6.2.1 - Estatísticas da ANOVA para os valores médios de cada frasco obtidos por ICP-MS e ICP OES para o estudo de estabilidade a longo prazo.

Elemento	Fonte de variação	Média Quadrática	F	F _c ^a
As	entre	0,017039	0,064871	3,284918
	dentro	0,262657		
Ca	entre	50919,58	0,359344	3,284918
	dentro	141701,4		
Cd	entre	0,871616	0,244724	3,284918
	dentro	3,561625		
Cr	entre	1,023386	0,200837	3,284918
	dentro	5,095608		
Cu	entre	0,038211	2,244744	3,284918
	dentro	0,017022		
Fe	entre	5,727242	0,129359	3,284918
	dentro	44,27406		
Mn	entre	27,74782	0,706726	3,284918
	dentro	39,26248		
Mg	entre	68461,44	1,951531	3,284918
	dentro	35080,88		
Na	entre	2532,571	0,520302	3,284918
	dentro	4867,502		
K	entre	0,536873	0,264264	3,284918
	dentro	2,031581		
P	entre	50832,33	1,167977	3,284918
	dentro	43521,7		
Pb	entre	0,273001	0,131146	3,284918
	dentro	2,081652		
Zn	entre	1,238263	1,99515	3,284918
	dentro	0,620637		

^aF_c para $\alpha = 0,05$

6.7 - Determinação da Umidade Residual

Primeiramente foi feito um teste de umidade em triplicata durante aproximadamente três dias para verificar se haviam possíveis diferenças no valor de umidade residual. Na Figura 6.7.1 pode-se observar que os resultados de umidade residual permaneceram constantes, conforme era o previsto, com umidade residual em torno de 6%.

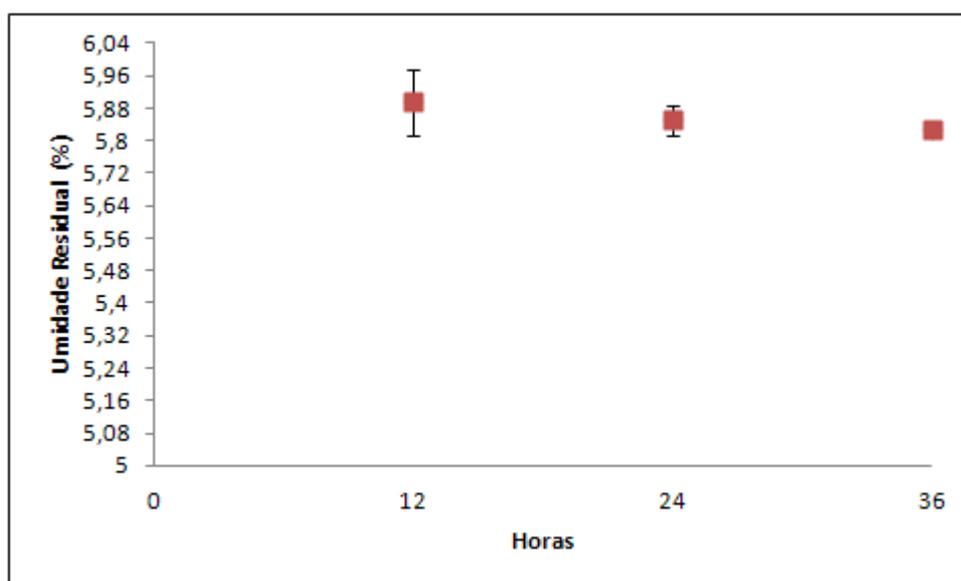


FIGURA 6.7.1 - Teste de umidade previamente realizado.

Após este estudo, foram, então, sorteados três frascos aleatoriamente e foram pesadas seis réplicas de cada um dos frascos, em torno de 1 g cada e seguindo o mesmo procedimento, deixando-se na estufa com amostra e recipiente em torno de 12 horas, para posterior pesagem. Na Tabela 6.7.1 estão apresentados os valores da umidade residual em porcentagem para cada frasco.

TABELA 6.7.1 - Umidade residual no candidato a material de referência de forrageira determinado em estufa a 105 °C por 12h.

Frascos	Umidade, %	Número de determinações
24	7,08 ± 0,06	6
33	6,14 ± 0,03	6
153	6,06 ± 0,06	6
Média final	6,42 ± 0,48	18

Assim, ficou definido que os usuários devem determinar a umidade residual em estufa, na temperatura de 105 °C, até massa constante, em alíquota que não será utilizada para determinação dos elementos estudados.

6.8 - Ensaio colaborativo

A amostra candidata a material de referência foi distribuída a cada um dos laboratórios participantes, os quais deveriam determinar os analitos que fosse

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

A Tabela 6.8.1 abaixo mostra os dados obtidos das seis repetições de cada laboratório participante.

TABELA 6.8.1 – Resultados reportados pelos participantes do ensaio colaborativo para caracterização do candidato a material de referência de forrageira (base seca)*

Lab	As	Cr	Pb	Cd	Ca	Mg	P	K	Fe	Mn	Zn	Na	Cu
1		1,63	3,54	14,44						68,54	8,01		5,23
1		1,24	3,15	14,75						69,49	8,11		5,94
1		1,65	3,55	15,06						69,69	8,13		5,10
1		1,64	3,35	14,90						71,21	8,71		5,26
1		1,41	3,36	14,90						69,20			5,05
1		1,43	3,10	14,63						68,70	7,6		4,56
2		2,58	3,54	24,15	4,32	3,07	0,75	18,17	97,74	91,32	9,17	0,0024	4,01
2		2,70	3,19	26,24	4,17	3,04	0,74	18,07	107,52	95,72	9,75	0,0021	3,72
2		2,26	3,68	26,01	4,59	2,97	0,75	17,85	101,10	93,55	10,1	0,0024	3,85
2		2,50	3,40	25,94	4,45	3,09	0,75	18,05	99,35	94,10	10,2	0,0022	3,99
2		2,54	3,54	25,79	4,44	3,11	0,75	17,77	98,98	92,58	10,3	0,0023	4,03
2		2,61	3,30	25,00	4,45	2,98	0,74	17,93	98,33	90,30	9,5	0,0024	4,10
3					3,25	0,61	0,70	5,61					
3					3,03	0,78	0,70	5,29					
3					3,16	0,65	0,68	5,29					
3					2,95	1,03	0,67	5,18					
3					3,12	0,78	0,68	5,07					
3					3,08	0,74	0,71	4,75					
4					5,15	2,78	0,59	14,23	79,17	74,81	6,36		3,99
4					4,72	2,60	0,55	12,99	75,57	68,22	4,22		3,54
4					4,98	2,78	0,56	13,97	79,90	71,81	5,71		3,70
4					5,19	2,88	0,63	14,26	88,70	73,32	6,54		2,99
4					4,96	2,75	0,57	13,78	81,06	71,06	5,18		3,69
4					5,13	2,76	0,66	13,79	75,44	69,83	5,20		3,91
5		1,65				3,22			46,70	71,30	10,72		
5		1,69				3,29			49,37	71,91	10,76		3,59
5		1,65				3,25			45,75	70,77			3,58
5		1,69				3,32			48,61	71,49	10,75		3,58
5		1,65				3,30			48,84	71,30	10,72		3,57
5		1,59				3,34			48,22	71,44			3,53
6	1,53	3,00	3,10	13,21	2,83			11,16	80,94	78,45	15,03	0,120	
6	1,61	3,10	2,99	14,26	2,28			11,44	93,81	75,18	10,74	0,125	
6	1,74	3,59		13,08	2,95			13,34	106,22	74,14	14,87	0,154	
6	1,41	2,89	3,25	13,75	2,70			10,82	82,41	71,17	11,15	0,121	
6	1,72	3,35	3,08	17,07	2,87			12,73	90,28	81,99	13,86	0,152	
6	1,75	3,89	3,38	14,81	3,79			13,66	112,02	90,43	15,12	0,152	
7			4,76	15,95					91,97	69,28			
7			4,78	16,45					102,46	69,80	9,39		3,70
7			5,63	16,45					107,48	69,71	9,09		3,13
7			4,78	15,85					91,75	68,81	8,96		3,25
7			5,61	16,05					94,05	68,49	9,17		3,33
7			4,76	15,95					90,73	69,24	9,03		3,47
8	1,74	3,22	5,70	20,47	5,74	3,31	0,72	13,35	144,47	80,94	13,68	0,173	5,40

8	1,71	4,42	6,15	20,75	5,16	2,97	0,77	13,40	125,83	83,44	11,67	0,130	4,80
8	1,80	3,86	5,82	20,80	5,51	3,19	0,68	13,41	142,19	85,68	11,33	0,141	5,15
8	1,55	2,93	9,02	19,56	5,55	3,20	0,93	13,36	124,85	86,73	11,64	0,152	4,86
8	1,56	4,56	6,90	21,75	5,58	3,22	0,77		131,79	86,97	13,12	0,173	5,83
8	1,72	3,88	6,91	22,23	5,55	3,19	0,70		137,10		14,10	0,206	5,63
9					0,53		0,06						
9					0,53		0,06						
9					0,59		0,08						
9					0,59		0,08						
9					0,60		0,08						
9					0,57		0,07						
10		5,50	5,00	16,20	4,59	2,47	0,67	9,60	86,00	77,00	9,50	0,430	3,00
10		5,00	4,70	16,00	4,48	2,56	0,66	9,56	88,00	76,00	10,00	0,430	3,00
10		6,00	4,30	16,00	4,52	2,48	0,65	9,80	84,00	76,00	9,50	0,430	3,00
10		5,50	4,80	16,00	4,58	2,55	0,67	9,65	87,00	77,00	10,00	0,420	3,20
10		5,50	5,00	16,00	4,59	2,53	0,66	9,60	88,00	76,00	10,00	0,430	3,00
10		5,50	5,00		4,52	2,50	0,66	9,70	85,00	75,00	9,50	0,430	3,40
11			3,26		4,21	2,57	0,66	11,20		56,80	2,60	0,149	3,30
11			3,33		4,20	2,60	0,70	11,10		57,20	2,40	0,156	3,50
11			2,86		4,00	2,50	0,60	10,70		54,50	2,10	0,148	3,50
11			2,86		4,00	2,40	0,60	10,60		53,60	2,80	0,146	4,30
11			3,43		4,10	2,50	0,70	11,00		56,10	2,10	0,138	3,00
11			2,66		4,10	2,50	0,60	10,60		55,20	2,00	0,126	2,80
12		5,37	4,61	19,53	4,05	2,98	0,56	10,11		76,44	10,13	25,73	2,73
12		5,80	4,15	20,72	4,00	2,83	0,56	9,55		75,79	12,00	14,01	2,13
12		4,64	4,75	19,18	5,45	3,17	0,57	8,13		73,55	10,12	8,91	2,34
12		3,23	4,22	19,45	3,58	2,24		7,61		73,66	9,45	17,58	3,07
12		4,76	4,33	19,37	4,77	3,11	0,54	6,23		74,03	8,80	14,19	2,80
12		2,48	4,23	19,93	4,94	3,21	0,53	7,37		73,05	11,03	10,88	2,15
13	1,76	2,84	4,40	20,16	5,02	3,19	0,99	12,64	89,39	86,18	9,23	0,142	3,33
13	1,68	3,32	3,96	18,99	5,01	3,12	0,90	11,76	90,50	80,72	9,93	0,149	3,48
13	1,69	2,74	3,71	19,32	5,00	3,18	0,98	11,44	90,72	80,76	9,62	0,134	3,59
13	1,69	2,70	4,07	19,08	5,16	3,17	0,95	12,40	94,76	77,61	9,49	0,134	3,51
13	1,78	3,31	3,80	20,50	5,17	2,82	1,06	13,16	86,49	78,26	8,53	0,126	3,57
13	1,72	3,16	3,55	20,12	5,00	2,92	1,10	11,99	99,72	78,66	8,65	0,128	3,56
14	1,77	3,84		21,16	4,89			11,86	92,54		10,14	0,131	
14	1,72	4,14		20,73	4,83			12,08	93,18		9,96	0,126	
14	1,70	3,89		20,84	4,81			11,75	95,75		9,76	0,126	
14	1,71	4,00		21,16	4,95			11,97	91,69		9,93	0,124	
14	1,71	4,35		20,84	4,74			11,75	92,01		9,95	0,125	
14	1,85	3,96		20,41	4,94			11,54	96,60		10,14	0,131	
15					4,60		0,50	11,50	104,63	74,35	8,81		9,35
15					4,70	3,30	0,50	11,00	105,83	73,92	8,91		9,52
15					4,80	3,10	0,50	11,00	103,55	72,72	9,75		9,53
15					4,80	3,30	0,50	11,60	116,14	73,59	9,15		9,22
15					4,80	3,40	0,50	10,60	118,31	73,70	9,36		9,62
15					4,60	3,30	0,50	10,50	102,68	72,40	9,88		9,49
16		4,19	5,25	25,31	3,93	2,87	0,36	25,84	58,29	79,44	13,22	0,180	3,04
16		4,90	5,29	24,33	4,06	2,94	0,43	19,76	67,79	76,88	14,51	0,200	3,11
16		5,75	5,15	24,52	3,48	2,88	0,45	21,13	83,52	73,52	13,80	0,210	3,02
16		3,63	4,97	24,81	4,11	3,01	0,43	17,33	71,90	75,21	14,71	0,210	2,76
16		3,72	5,49	25,77	3,43	2,88	0,51	19,35	56,72	74,88	15,54	0,200	3,06
16		3,75	5,09	25,94	4,02	2,87	0,53	23,45	74,65	72,03	15,74	0,220	2,91

*Grandezas dos analitos: g.kg⁻¹ para Ca, Mg, Na, P e mg.kg⁻¹ para Cd, Cr, Pb, As Cu, Fe, K, Mn, Zn

Para cada analito determinado em cada laboratório participante foi aplicado o teste de Grubbs para a exclusão de *outliers* para cada réplica. Neste teste compara-se o valor da razão entre a diferença de cada resultado obtido (x_i) e a média de todos os resultados (\bar{X}) em relação ao desvio padrão (s). Caso o valor desta razão seja maior que o valor crítico tabelado, então a presença de um valor *outlier* é comprovada a um nível de significância de 95% (GRUBBS, 1969).

$$G = \frac{[x_i - \bar{X}]}{s} \quad (10)$$

Na Tabela 6.8.1 estão os resultados reportados completos, ou seja, sem a retirada dos *outliers* de cada laboratório identificados pelo teste de Grubbs.

O teste de Cochran é usado para comparar a maior variância com as outras variâncias de um grupo. Pode ser usado para comparar a precisão de vários analistas, vários métodos ou vários laboratórios. Neste caso, o teste foi utilizado para se identificar possíveis laboratórios *outliers*. Na equação 11 indica-se a variância máxima obtida ($s^2_{m\acute{a}x}$), a soma de todas as variâncias ($\sum_{i=1}^p s_i^2$) e o número de laboratórios participantes.

Quando o valor obtido por esta razão for maior do que o valor crítico tabelado, está explícita a presença de um, a um nível de 95% de confiança (LOPES, 1999).

$$C = \frac{s^2_{m\acute{a}x}}{\sum_{i=1}^p s_i^2} \quad (11)$$

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

A estes dados, foi aplicada a estatística baseada no índice z. Este índice é utilizado em programas interlaboratoriais para avaliar o desempenho dos participantes (THOMPSON et al, 2006, SOUZA et al., 2009.) O cálculo do índice z pode ser realizado através da equação 12:

$$z = \frac{(x_i - \bar{X})}{\sigma_p} \quad (12)$$

O termo $(x_i - \bar{X})$ reflete o erro cometido na quantificação reportada do laboratório participante com relação ao valor designado, onde: x_i é o resultado indicado pelo laboratório; \bar{X} o valor designado ou a melhor estimativa dele e σ_p é o desvio padrão alvo. Em relação aos valores do índice z, quanto mais próximo o valor de z de zero, melhor será o resultado reportado pelo laboratório. Se z for igual a ± 2 , o desempenho do laboratório é considerado aceitável e se z for maior que ± 3 , os desempenhos são considerados insatisfatórios ou inaceitáveis (THOMPSON, 2006).

Para este estudo, o ensaio colaborativo teve somente a intenção de se obter um valor de consenso designado para o material candidato através das normas descritas na ISO 35, 2006, sem o compromisso de avaliar o desempenho dos laboratórios participantes.

A seguir, apresentam-se na Figura 9.1 os valores obtidos do índice z para os dados reportados do ensaio colaborativo.

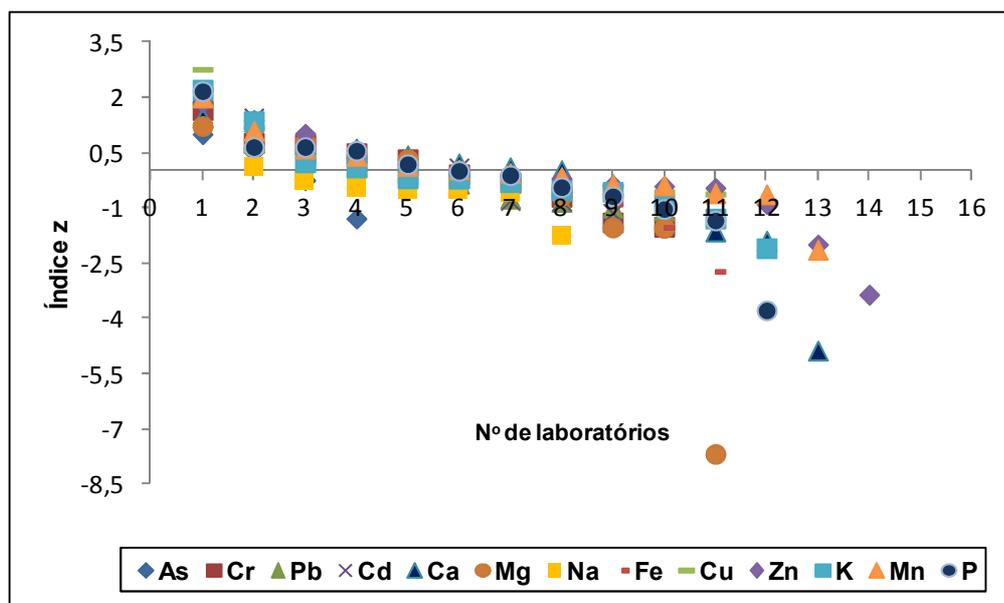


FIGURA 6.8.1. Valores obtidos do índice z para o ensaio colaborativo

Percebe-se que, para alguns analitos, há uma variabilidade maior do índice z do que para outros. Assim, através dessas ferramentas foi possível visualizar, se há laboratórios com problemas de repetibilidade (variação intralaboratorial), problemas de reprodutibilidade (variação interlaboratorial) e se há laboratórios que apresentaram resultados que são extremos e, portanto, passíveis de serem eliminados (MOREIRA, 2010c).

Poucos laboratórios reportaram os resultados principalmente para As (somente 4) em relação aos outros elementos que apresentaram concentrações maiores o que demonstra ainda possível dificuldade dos laboratórios em conseguir obter medidas de consenso para elementos que requerem algum tipo de tratamento diferenciado ou a utilização de técnicas que ofereçam um limite de detecção menor.

Após os tratamentos estatísticos aplicados, foi realizada também a análise de variância ANOVA e através dos resultados, foi possível estimar os valores de consenso e as incertezas padrão devido a caracterização para As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Pb e Zn.

6.9 - Determinação das incerteza

6.9.1 - Estimativa das incertezas

A abordagem das incertezas em medições químicas, conforme preconizadas pelos assuntos de metrologia indicada na norma ISO Guia 35 (ISO, 2006), que dispõe sobre os procedimentos para a certificação de materiais de referência, pressupõe a declaração de suas incertezas de todas as etapas de sua preparação. Assim, é exigido do produtor de material de referência agregar a incerteza dos valores certificados.

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

$$U_{MRC} = k \sqrt{u_{char}^2 + u_{bb}^2 + u_{sts}^2 + u_{lts}^2} \quad (13)$$

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

O valor de consenso de cada analito foi obtido através da media dos valores de consenso reportados pelos laboratórios participantes do ensaio colaborativo.

Para o cálculo das incertezas da homogeneidade, da estabilidade e da caracterização foi seguida a norma do ISO Guia 35 (ISO, 2006).

Para o teste de homogeneidade, através dos resultados obtidos pela ANOVA, primeiramente, foi calculado o desvio-padrão da homogeneidade entre frascos através da equação (14):

$$s_{bb}^2 = \frac{MQ_{entre} - MQ_{dentro}}{n_o} \quad (14)$$

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

Em seguida, foi calculado o desvio-padrão da repetibilidade pela equação (15):

$$s_r = \sqrt{MQ_{dentro}} \quad (15)$$

Para se obter a incerteza padrão relacionada à homogeneidade empregou-se a equação (16):

$$u_{bb} = \sqrt{\frac{MQ_{dentro}}{n}} \sqrt[4]{\frac{2}{vMQ_{dentro}}} \quad (16)$$

Onde v é o número de graus de liberdade para fonte de variação dentro do grupo, obtidos através da ANOVA. Assim, é possível estimar a variabilidade máxima entre frascos.

A estimativa da incerteza relacionada à estabilidade a curto prazo foi considerada desprezível para a estimativa da U_{CRM} , pois as condições de transporte devem ser tais que não causem alteração no material candidato para gerar maior confiabilidade no uso de um material de referência (ABNT/ISO Guide 35, 2006). Foram consideradas somente as incertezas padrão relacionadas à estabilidade a longo prazo. Através dos resultados obtidos para este teste foram calculados os parâmetros b_1 e b_0 de acordo com as equações 17 e 18.

$$b_1 = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} \quad (17)$$

$$b_0 = \bar{Y} - b_1 \bar{X} \quad (18)$$

Nas quais X refere-se aos meses de duração do teste e Y à concentração do analito. O desvio-padrão das medidas ao longo dos meses foi obtido pela equação 19. Também se pode obter esse valor através da ANOVA para regressão linear com os dados obtidos durante os meses de estudo, que seria o valor $MQ_{\text{resíduo}}$ e a incerteza associada à inclinação da reta pelas equações 19 e 20:

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - b_0 - b_1 X_i)^2}{n - 2} \quad (19)$$

$$s(b_1) = \frac{s}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}} \quad (20)$$

Aplicando-se o fator t de Student para $n-2$ graus de liberdade a 95% de confiança, onde t é igual a 4,30, desde que $|b_1| \leq t_{0,95, n-2} \cdot s(b_1)$, nenhuma instabilidade deveria ser comprovada. Da equação 21 vem, então, a incerteza associada à estabilidade a longo prazo (u_{lts}), onde t é o número de meses em que o teste foi realizado (SILVA, 2011).

$$u_{lts} = s_{b1} \cdot t \quad (21)$$

A estimativa da média a partir da ANOVA e da sua incerteza de caracterização (u_{char}) é calculada a partir dos parâmetros obtidos da ANOVA de acordo com as recomendações da ISO Guia 35 (ISO, 2006), indicadas nas equações 22, 23 e 24:

$$u = u_{\text{car}} = \sqrt{\frac{s_L^2}{p} + \frac{s_r^2}{n \cdot p}} \quad (22)$$

$$s_r^2 = MQ_{\text{dentro}} \quad (23)$$

$$s_L^2 = \frac{MQ_{\text{entre}} - MQ_{\text{dentro}}}{n_o} \quad (24)$$

Os termos s_r^2 e s_L^2 são as variâncias dentro do frasco e entre frascos, respectivamente. O símbolo n_o significa número de determinações, sendo que neste trabalho foram 6 determinações, e p é o número de laboratórios participantes.

6.9.2 - Atribuição dos valores de propriedades e incertezas obtidas

Através da informação sobre as incertezas associadas aos valores das propriedades certificadas, o laboratório usuário pode verificar se existe ou não a exatidão e a precisão desejadas, ao introduzi-los nos processos analíticos a serem controlados (EURACHEM/CITAC, 2002; ISO, 2006).

Na Tabela 6.9.2.1, encontram-se os resultados das incertezas-padrão combinadas para a caracterização (u_{char}), homogeneidade (u_{bb}), e estabilidade a longo prazo (u_{its}) e a incerteza expandida associada aos valores de concentração U_{RM} .

TABELA 6.9.2.1 - Estimativas de todas as incertezas obtidas para cada elemento (base seca).

Elementos (unidade)	U_{car}	U_{bb}	U_{lts}	U_{MR}
As (mg kg⁻¹)	0,026	0,06	0,48	0,97
Cr (mg kg⁻¹)	0,4	0,11	0,72	1,66
Pb (mg kg⁻¹)	0,28	0,12	0,83	1,8
Cd (mg kg⁻¹)	1,26	0,2	2,21	5,1
Ca (g kg⁻¹)	0,25	0,05	0,14	0,58
Mg (g kg⁻¹)	0,101	0,015	0,193	0,44
Na (g kg⁻¹)	0,04	0,006	0,041	0,12
Fe (mg kg⁻¹)	4,37	1,65	4,45	12,9
Cu (mg kg⁻¹)	0,256	0,24	0,084	0,72
Zn (mg kg⁻¹)	0,633	0,006	0,465	1,57
K (g kg⁻¹)	0,84	0,08	0,84	2,38
Mn (mg kg⁻¹)	2,15	0,59	8,98	18,52
P (g kg⁻¹)	0,053	0,01	0,08	0,19

As informações na Tabela 6.9.2.1 demonstram que, para a maioria dos elementos em estudo houve maior contribuição para a incerteza da estabilidade a longo prazo. Isto ocorreu devido ao desvio-padrão da inclinação da curva que é multiplicado pelo número de meses analisados. Quanto mais longo este estudo, maior será o valor a ser multiplicado e, conseqüentemente, maior a incerteza-padrão combinada associada.

Tendo por base o valor designado para cada analito, obtido pelos dados do ensaio colaborativo, foi feita uma relação sobre quanto representava a contribuição de cada incerteza em porcentagem. Para cada analito foi obtida a porcentagem utilizando-se a equação 13, obtendo-se a incerteza expandida. A Tabela 6.9.2.2 mostra os valores de referência tendo como contribuição as incertezas relacionadas à estabilidade e à homogeneidade determinadas por ICP OES e ICP-MS, conforme mencionados neste trabalho, na incerteza expandida em porcentagem (U_{MR}).

TABELA 6.9.2.2 – Valores de referência atribuídos aos elementos determinados no RM de forrageira (g kg^{-1} ou mg kg^{-1}) acompanhado da incerteza expandida (U_{MR}) em porcentagem (base seca).

Elementos (unidade)	Valor determinado	U_{RM} (%)
As (mg kg^{-1})	1,69±0,97	57
Cr (mg kg^{-1})	3,30±1,66	50
Pb (mg kg^{-1})	4,04±1,8	44
Cd (mg kg^{-1})	19,9±5,1	26
Ca (g kg^{-1})	4,37±0,58	13
Mg (g kg^{-1})	2,95±0,44	11
Na (g kg^{-1})	0,196±0,12	59
Fe (mg kg^{-1})	91±12,9	14
Cu (mg kg^{-1})	4,0±0,72	19
Zn (mg kg^{-1})	9,9±1,6	16
K (g kg^{-1})	12,0±2,4	20
Mn (mg kg^{-1})	76,0±18,5	24
P (g kg^{-1})	0,65±0,19	30

Deve-se destacar que também foram obtidos os mesmos valores da incerteza expandida em porcentagem (U_{RM}) tanto na contribuição das incertezas da homogeneidade determinadas por ICP OES e ICP-MS como nas incertezas da homogeneidade obtidas por INAA para As, Cr, Cd, Ca, Na, Fe, Zn e K.

Dessa forma, as maiores incertezas expandidas encontradas foram para o As e Na.

Na Tabela 6.9.2.3 encontram-se os valores de referência obtidos através da INAA para As, Cr, Cd, Ca, Na, Fe, Zn e K com suas respectivas incertezas expandidas (U_{RM}) em porcentagem.

TABELA 6.9.2.3 – Valores de referência atribuídos aos elementos determinados na forrageira (g kg^{-1} ou mg kg^{-1}) acompanhado da incerteza expandida (U_{RM}) em porcentagem, obtidos por INAA (base seca).

Elementos (unidade)	Valor determinado	U_{RM} (%)
As (mg kg^{-1})	1,74±0,05	57
Cr (mg kg^{-1})	4,0±0,2	50
Cd (mg kg^{-1})	20,9±0,3	26
Ca (g kg^{-1})	4,9±0,8	13
Na (g kg^{-1})	0,13±0,003	59
Fe (mg kg^{-1})	94 ±2	14
Zn (mg kg^{-1})	9,98±0,15	16
K (g kg^{-1})	11,80±0,19	20

Capítulo 7

Conclusões

7 – Conclusão

A partir do estudo de doses de As, Cd, Cr e Pb em 16 vasos, foi possível a obtenção de material vegetal com contaminantes inorgânicos em seus tecidos, visando à produção de amostras de referência que apresentam em sua composição, além dos macro e micronutrientes, de As, Cd, Cr e Pb para controle de qualidade de laboratórios, exatidão e validação de métodos analíticos;

Foram concluídas todas as etapas de preparo do material candidato a material de referência de forrageira nacional;

Os estudos de homogeneidade, estabilidade a curto prazo, estabilidade a longo prazo e caracterização, juntamente com as incertezas, do material de referência de forrageira obedeceram aos princípios das normas internacionais;

A participação dos diversos laboratórios para o ensaio colaborativo foi de extrema importância para a obtenção dos valores de consenso, ou seja, a determinação da caracterização para As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Pb e Zn;

Este trabalho possibilitou o desenvolvimento de um material de referência agropecuário, tão carente neste setor, demonstrando ser viável a produção e a caracterização de materiais de referência nacionais, em especial a forrageira.

Capítulo 8

Referências Bibliográficas

8 – Referências Bibliográficas

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

ABNT, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS ABNT ISO/IEC Guia 43-1. Ensaio de proficiência por comparações interlaboratoriais – Parte1: Desenvolvimento e operação de programas de ensaios de proficiência, 1999.

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

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

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

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

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

AGBENIN, J. O. & CANTARELLA, H. “Performance of commercial soil laboratories in a proficiency test program in Brazil” *Accred Qual Assur*, 16:553–559, 2011.

ALLOWAY, B.J. *Heavy metals in soils*. new york: john wiley & sons, 1990. 339p.

ANDRIGUETTO, J. M. “Nutrição animal: alimentação animal nutrição animal aplicada”. 4. ed. São Paulo: Nobel, v.2, 1985.

ARAÚJO, G. C. L., GONZALEZ, M . H., FERREIRA, A. G., NOGUEIRA, A. R. A, & NÓBREGA, J. A. “Effect of acid concentration on closed-vessel microwave- assisted digestion of plants material”. *Spectrochimica Acta Part B* 57, 2002, 2121-2132

ATSDR – Agency for Toxic Substances and Disease control. Toxicological profile. Disponível em: < <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/index.asp>>, Acesso em Janeiro, 2013.

BACCHI, M.A. & FERNANDES, E.A.N. “Quantu - design and development of a software package dedicated to k0-standardized INAA” *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, budapest, v257, n. 3, 577-582, 2003.

BACCHI, M.A.; FERNANDES, E.A.N. & OLIVEIRA, H. "Brazilian experience in k0 standardized neutron activation analysis". Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, v.245, n.1, p.217-222, 2000.

BAH, A.M., DAÍ, H., ZHAO, H. S., CAO, F., ZHANG, G. & WU, F. "Effects of cadmium, chromium and lead on growth, metal uptake and antioxidative capacity in *typha angustifolia*" Biol trace Elem Res, DOI 10.1007/s12011-010-8746-6, 2010;

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S. & BRUNS, R.E. "Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria". Editora da Unicamp: Campinas, SP, 2001.

BISPO, J. M. A. Certificação de material de referência de minério de ferro utilizando programa interlaboratorial. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, 2006.

BODE, P.; FERNANDES, E.A.N. & GREENBERG, R.R. "Metrology for chemical measurements and the position of INAA". Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 245 (1): 109-114, 2000.

CAMPOS, M. L., GUILHERME, L. R. G., LOPES, R. S., ANTUNES, A. S., MARQUES, J. J. G. S. M. & CURI, N. "Teor e capacidade máxima de adsorção de arsênio em latossolos brasileiros" R. Bras. Ci. Solo, 31:1311-1318, 2007

CARIONI, V.M.O., CHELEGÃO, R., NAOZUKA, J. & NOMURA C.S., "Feasibility study for the preparation of a tuna fish candidate reference material for total As determination". Accred Qual Assur, 16:453-458, 2011.

CAROLI, S.; FORTE, G.; ALESSANDRELLI, M.; CRESTI, R.; SPAGNOLI, M. D'ILIO, S.; PAUWELS, J. & KRAMER, G. N. "A pilot study for the production of a certified reference material for trace elements in honey". Microchemical Journal, 67: 227-233, 2000.

CARRILHO, E. M. V. M., GONZALEZ, M. H., NOGUEIRA, A. R. A. & CRUZ, G. "Microwave-assisted acid decomposition of animal and plant-derived samples for element analysis" J. Agric. Food Chem., 50, 4164-4168, 2002.

CARVALHO, A. V. S., CARVALHO, R., ABREU, C. C. P. & FURTINI NETO, A. E. "Produção de matéria seca e de grãos por plantas de feijoeiro (*phaseolus vulgaris* L.) cultivadas em solos tratados com metais pesados" Quim. Nova, Vol. 31, No. 5, 949-955, 2008.

CETEM - Centro de Tecnologia Mineral, Certificado de análise, BXPA-1, bauxita (Juriti-pará, Brasil), 2007a.

CETEM - Centro de Tecnologia Mineral, Certificado de análise, CBPA-1, minérios de sulfeto de cobre (mina do sossego, Pará), 2007b

CETEM - Centro de Tecnologia Mineral, Certificado de análise, CBPA-2, concentrado de sulfetos de cobre (mina do sossego, Pará), 2007c.

CETEM – Centro de Tecnologia Mineral, Ministério da Ciência e Tecnologia Disponível em < (<http://www.cetem.gov.br/mrc/historico.htm>)>. Acesso em: Janeiro de 2013.

CETESB, “Valores orientadores para solos e águas subterrâneas no estado de São Paulo”. São Paulo: CETESB, 2005, 4p.

CHELEGÃO R. Produção de material de referência de peixe visando à determinação de Hg e MHg+ Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2012. Tese de doutorado, 103 p.

CHUDZINKA, M.; DEBSKA, A. & DANUTA, B. “Method validation for determination of 13 elements in honey samples by ICP-MS”. *Accred. Qual. Assur.*, 16: 1-9, 2011.

CHUI, Q. S. H., IAMASHITA C. O. & BISPO, J. M. DE A. “Estudo de homogeneidade de lote de material silício metálico candidato a material de referência” *Quim. Nova*, vol. 28, no. 3, 497-501, 2005.

COMAR - Banco internacional de dados de materiais de referencia certificados. Disponível em <<http://www.comar.bam.de/en/>>. Acesso em: Janeiro de 2013.

COTTA A. J. B. & ENZWEILER, J. “Certificate of analysis of the Reference Material BRP-1 (Basalt Ribeirão Preto)” *Geostand. Geoanal. Res.* V.32, n.2, p. 231-235 , 2008.

CURRIE, L.A. “Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities. (IUPAC recommendations 1995)” *Anal chim Acta*, 391, 105-126, 1999.

DE BIÈVRE, P A “Metrological traceability chain prevents circular reasoning in measurement design” *Accred Qual Assur* 15:491–492 , 2010b.

DE BIÈVRE, P. “Metrological traceability is a prerequisite for evaluation of measurement uncertainty” *Accred Qual Assur* (2010) 15:437–438, 2010a

ELIAS, C. Amostragem sustentável de bromélias nativas para estudos ambientais em unidades de conservação. Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP, 2008. Dissertação de mestrado, 174 p.

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

EMMONS, H.; FAJGELJ, A.; VAN DER VEEN, A.; & WATTERS, R. “New definitions on reference materials” *Accreditation and quality assurance*. Springer Verlag, 2006. DOI.1007/s00769-006- 0089-9.

EUCLIDES V. P. B. & EUCLIDES FILHO, K.. “Uso de animais na avaliação de forrageiras, EMBRAPA-CNPQC” *Documentos*, 74 , Campo Grande, MS, 1998.

EURACHEM/CITAC Guide: Determinando a Incerteza na Medição Analítica, 2ªEd., ABNT, INMETRO, SBM – Brasil, 2002.

FERRARI, A. A. Caracterização química de tomates (*Lycopersicon esculentum* Mill.) empregando análise por ativação neutrônica instrumental. Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP, 2008. Dissertação de mestrado, 151 p.

FRANÇA, E.J.; FERNANDES, E.A.N.; & BACCHI, M.A. “Ni-Cr alloy as neutron flux monitor: composition and homogeneity assessment by NAA” *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, v.257, n.1, 113-115, 2003.

GERDES, L., WERNER, J. C., COLOZZA, M. T., POSSENTI, R. A. & SCHAMMASS, E. A. “Avaliação de Características de Valor Nutritivo das Gramíneas Forrageiras Marandu, Setária e Tanzânia nas Estações do Ano” *Rev. Bras. Zootec.*, 29(4):955-963, 2000

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

GREENBERG R. R. “Toxic metals in seafood – evaluation of measurement results”, Toxic metals in seafood workshop, SIM General Assembly Trindade Tobago, 2005.

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

HETTER, K. M, BELLIS D. J., GERAGHTY C., TODD, A. C. & PARSONS P. J. Development of candidate reference materials for the measurement of lead in bone *Anal Bioanal Chem* 391:2011–2021, 2008.

INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade na Saúde. Disponível em: < <http://www.incqs.fiocruz.br>>. Acesso em: Janeiro de 2013.

INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Disponível em < <http://www.inmetro.gov.br> >. Acesso em: Janeiro de 2013.

IPT: Instituto de Pesquisas Tecnológicas. Disponível em <<http://www.ipt.br/solucoes/54.htm>>. Acesso em: Janeiro de 2013.

ISO, International Organization for Standardization, 2006, Reference materials – General and statistical principles for certification (ISO Guide 35). 3rd ed. Genève, Switzerland, 64p.

KABATA-PENDIAS, A. & MUKHERJEE, A. B., Trace Elements from Soil to Human, Springer, 2007, 550p.

KABATA-PENDIAS, A. & PENDIAS, H. Trace elements in soil and plant. 3.ed. Boca Raton, CRC, 2001. 413p.

KRUG, F. J. Métodos de preparo de amostras; fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar, 1 ed. rev., Piracicaba, 2008.

KUPIEC, K., KONIECZKA P., & NAMIEŚNIK J. "Critical Reviews in Analytical Chemistry" Crit Rev Anal Chem , vol. 39, no. 4, pp. 311-322, 2009

LIMA, M. L. P., BERCHIELLI, T. T., NOGUEIRA, J. R., RUGGIERI, A. C., AROEIRA, L. J. M., SALMAN, A. K. D. & SOARES, J. P. G. "Estimativa do Consumo Voluntário do Capim-Tanzânia (*Panicum maximum*, Jacq. cv. Tanzânia) por Vacas em Lactação sob Pastejo Rotacionado" Rev. bras. zootec., 30(6):1919, 2001.

LINSINGER, T.P.J., PAUWELS, J., VAN DERVEEN, A.M.H., SCHIMMEL, H. & LAMBERTY, A. "Homogeneity and stability of reference materials" Accred. Qual Assur, v.6, p.20-25. 2001

LOPES, P. A., Probabilidades e Estatística, Rio de Janeiro, RJ, Reichmann & Affonso Editores, 1999.

MALAVOLTA, E. Fertilizantes e seu impacto ambiental: metais pesados mitos, mistificação e fatos. São Paulo: Produquímica, 1994. 153 p.

MALAVOLTA, E. Manual de nutrição mineral de plantas. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006. 638p.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/exportacao>>. Acesso em: Janeiro de 2013.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/bem-estar-animal>>. Acesso em: Janeiro de 2013.

MARSOLA, T., MIYAZAWA, M. & PAVAN, M. A. "Acumulação de cobre e zinco em tecidos do feijoeiro em relação com o extraído do solo". R. Bras. Eng. Ag. e Ambiental, v.9, n.1, p92-98, 2005.

MEISEL, T. & KANE J. S. "The future demand for geological reference materials" Accred Qual Assur, 16:407–414, 2011.

MELO R. F., DIAS, L. E., MELLO, J. W. V. & OLIVEIRA J. A. "Potencial de quatro espécies herbáceas forrageiras para fitorremediação de solo contaminado por arsênio" R. Bras. Ci. Solo, 33:455-465, 2009.

MONTEIRO, F.A., RAMOS, A.K.B., DE CARVALHO, D.D., DE ABREU, J.B.R., DAIUB, J.A.S., DA SILVA, J.E.P. & NATALE, W. "Cultivo de *Brachiaria brizantha* Stapf. cv. Marandu em solução nutritiva com omissões de macronutrientes" Sci. Agri., Piracicaba, 52(1):135-141, jan./abr.1995

MOREIRA, E. G. Preparo de caracterização de um material de referencia de mexilhão Perna perna (*Linnaeus*, 1758). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo-SP, 2010c. Tese de doutorado, 283p.

MOREIRA, E. G., VASCONCELLOS, M. B. A., CATHARINO, M. G. M., MAIHARA, V. A. & SAIKI, M. "Application of INAA complementary gamma ray photopeaks to the homogeneity study of a mussel candidate reference material" J Radioanal Nucl Chem, 283:819–822, 2010a.

MOREIRA, E. G., VASCONCELLOS, M. B. A., CATHARINO, M. G. M., MAIHARA, V. A. & SAIKI, M. "Perna perna mussel reference material: short term stability assessment" J Radioanal Nucl Chem, 282:957–962, 2009.

MOREIRA, E. G., VASCONCELLOS, M. B. A., CATHARINO, M. G. M., MAIHARA, V. A. & SAIKI, M. "Long-term stability study on a Perna perna mussel candidate reference material" Accred Qual Assur, 15:233–238, 2010b.

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

NAGAJYOTI P. C., LEE, K. D. & SREEKANTH, T. V. M. "Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review". Environ. Chem. Lett. 8: 199-216, 2010.

NAMIENIK, J. & ZYGMUNT, B. "Role of reference materials in analysis of environmental pollutants" The Science of the Total Environment 228: 243-257, 1999.

NICODEMO, M. L. F., LAURA, V. A. & MOREIRA, A. "Nutrição mineral de bovinos de corte em pastejo - respostas de plantas forrageiras à adubação e de bovinos à suplementação da pastagem". Embrapa Pecuária Sudeste. Documentos, 81, São Carlos, SP, 2008

NOGUEIRA, A.R.A & SOUZA, G.B. Manual de laboratório: Solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos, São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2005.

NOGUEIRA, R., SILVA, G E. B., QUEIROZ, S. M., MELLO, M. G. & ROCHA, W. F. C. "Traceability of measurement results in chemistry: a case study of certification of three new pharmaceutical reference materials" Accred Qual Assur , 17:497–510, 2012.

OSTERMANN, M., BERGER, A., MANS, C., SIMONS, C., HANNING, S., JANSEN, A., KREYENSCHMIDT, M. "Results and effects of homogeneity and stability studies carried out by X-ray fluorescence on the new reference material BAM-H010" Accred Qual Assur, 16:515–522, 2011.

PAIVA, H. N., CARVALHO, J. G. & SIQUEIRA, J. O. "Efeito da aplicação de cádmio sobre o teor de nutrientes em mudas de cedro (*Cedrela fissilis* VELL)" Ciência Florestal, Santa Maria, v. 11, n. 2, p. 153-162, 2001

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

PEREIRA, C. D.; GARCIA, E. E.; SILVA, F. V.; NOGUEIRA, A. R. A. & NÓBREGA, J. A. "Behaviour of arsenic and selenium in na ICP-QMS with collision and reaction interface" *J. Anal. At. Spectrom.*, 25: 1763-1768, 2010.

RAIJ, B. V. "Fertilidade do solo e manejo de nutrientes" Piracicaba: International Plant Nutrition Instituto, 420 p., 2011.

SANTOS, F. S., SOBRINHO, N. M. B. A. & MAZUR, N. "Mecanismos de tolerância de plantas a metais pesados" Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, viçosa, 2006. *Nutrição Mineral de Platas*, 432p. (Ed. FERNANDES, M. S.).

SCHARF, H., BECKER, R., BREMSER, W. BUGE, H. G., LÜCK, D. "Certification of the mass fractions of trace elements and pentachlorophenol in an impregnated wood reference material" *Accred Qual Assur*, 15:613–619, 2010.

SENESI, G.S., BALDASSARRE G., SENESI N. & RADINA B. "Trace element inputs into soils by anthropogenic activities and implications for human health" *Chemosphere*, Vol. 39, No. 2, pp. 343-377, 1999.

SILVA, da M. S.; SOUZA, S. N., LENZI, E. & LUCHESE, E. B. "Comportamento do chumbo (Pb) em latossolo vermelho escuro textura média tratado com lodo contaminado e sua absorção pelas plantas" *Acta Scientiarum* 20(4):427-432, 1998.

SILVA, P. H. T. Avaliação de parâmetros e produção de materiais de referência de mistura mineral para nutrientes e contaminantes inorgânicos, Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, 2011. Dissertação de mestrado, 148p.

SOUZA V., RODRIGUES, J. M., BANDEIRA, R. D.C.C., VALENTE, L. A. N., SOUSA, M. V. B., SILVA, V. F. & SILVA, R. A. L. "Evaluation of the stability of ethanol in water certified reference material: measurement uncertainty under tranpost and storage conditions" *Accred Qual Assur* v.13, 717-721, 2008.

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

SPADOTTO C. A & RIBEIRO, W. C. *Gestão de resíduos na agricultura e industria*, Botucatu: FEPAF, 319 p., 2006

STOEPLER, M.; WAYNE R. W. & PETER J. J.; *Reference Materials for Chemical Analysis; Certification, Availability and Proper Usage; WILEY-VCH* (2001).

TAGLIAFERRO, F.S. *Metrologia em química: estudo da qualidade de cafés brasileiros*. Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP, 2003. Tese de doutorado, 151 p.

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

TAVERNIERS, I.; LOOSE, M. D. & BOCKSTAELE, E. V. "Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance" Trends in Analytical Chemistry, 23 (8): 535-552, 2004.

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

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

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

TU, C. & MA, L.Q. "Effects of arsenate and phosphate on their accumulation by an arsenic-hyperaccumulator *Pteris vittata* L." Plant Soil, 249:373-382, 2003.

ULRICH, J. C. Preparação e caracterização de um material de referência de peixe, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo-SP, 2011. Tese de doutorado, 129p.

VAN DER VEEN, A. M. H., LINSINGER T. P. J., SCHIMMEL, H., LAMBERTY, A., PAUWELS, J. "Uncertainty calculations in the certification of reference materials - Characterisation and certification" Accred Qual Assur, 6:290-294, 2001.

VIEIRA, E. C., Avaliação de Potencialidades e Aplicações de Espectrômetros com Plasma Acoplado Indutivamente em Análises Químicas. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2007. Tese de doutorado. 112p.

VIM-Vocabulário Internacional de Metrologia: conceitos fundamentais e gerais de termos associados (VIM 2012). Duque de Caxias, 1. Ed. RJ : INMETRO, 2012, 94 p.

WANG, H., MA, K. ZHANG, W., HUANG T., DAI X, LI J., SUN G. & LI H. "Production of three certified reference materials for water content based on mixed solutions of butanol, xylene and propylene carbonate" Accred Qual Assur DOI 10.1007/s00769-012-0930-2

ZSCHUNKE, A.; Reference materials in analytical chemistry - A guide for selection and use, Springer, 2000.

ZSCHUNKE, A.; The role of reference materials in analytical chemistry, *Accred Qual Assur* 8 (2003) 247-251.