



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E HUMANAS**

**Bacharelado em Química**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**GUILHERME RODRIGUES**

**Estudo da homogeneidade para As, Cd, Co, Cu, Fe,  
Pb, Se e Zn em material de referência de tecido  
animal candidato a certificação.**

2017

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E HUMANAS**  
**Bacharelado em Química**

**GUILHERME RODRIGUES**

**Estudo da homogeneidade para As, Cd, Co, Cu, Fe, Pb, Se e Zn em material de referência de tecido animal candidato a certificação.**

*Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Centro de Ciências Naturais e Humanas da Universidade Federal do ABC para obtenção da Graduação em Química*  
*Orientador: Prof. Dr. Bruno Lemos Batista*

Santo André  
Abril/ 2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Rodrigues, Guilherme

Estudo da homogeneidade para As, Cd, Co, Cu, Fe, Pb, Se e Zn em material de referência de tecido animal candidato a certificação.

36 p.

Trabalho de conclusão de curso, apresentado ao Centro de Ciências Naturais e Humanas da Universidade Federal do ABC para obtenção da Graduação em Química

Orientador: Prof. Dr. Bruno Lemos Batista.

1. ICP-MS 2. Materiais de Referência 3. Metais 4. Homogeneidade 5. Massa mínima

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Guilherme Rodrigues

Estudo da homogeneidade para As, Cd, Co, Cu, Fe, Pb, Se e Zn em material de referência de tecido animal candidato a certificação.

Trabalho de conclusão de curso, apresentado ao Centro de Ciências Naturais e Humanas da Universidade Federal do ABC para obtenção da Graduação em Química.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Lemos Batista.

Aprovado em \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

Banca Examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariselma Ferreira – CCNH/UFABC

---

Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Bruno Lemos Batista – CCNH/UFABC

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Heloisa França Maltez – CCNH/UFABC

## AGRADECIMENTOS

E com esse trabalho encerro um longo período iniciado em 2008, que marcou muito a minha vida.

Agradeço a Deus e aos amigos espirituais que estão sempre ao meu lado.

A minha família, em especial minha mãe Vera Lúcia Giovanini, meu pai Juvenal Cassimiro Rodrigues, e minha avó Rosalina (em memória) pelo apoio dado desde sempre. Agradeço pela compreensão da distância e do tempo dedicado aos estudos e trabalho. Ao meu irmão Henrique Rodrigues, que estará sempre comigo em cada jornada da vida.

Aos amigos de curso e profissão Anselmo, Vivi, Ed Carlos, Alan, Érica, Verô, Giovanna, outros de estudo, Edilene, Pedro Luz, Marcinha e muitos outros que vou precisar de algumas páginas para citá-los. Obrigado por compartilhar seus conhecimentos e amizade.

A todos meus amigos, em especial, Giulia Gallo, Gabi Menezes, Camila Prado, Jéssica Camões, Camila Reis, por compartilharem e ajudarem sempre a superar os momentos difíceis.

Aos amigos da Rep Limerrrr...A! e da Rep Digna, que me ensinaram em muito a conviver com diferenças, em especial ao Maycon “Dedo” Lopes, Rodrigo “Menu”, Lucas “Jesus” Tozatti, que vieram de Limeira pra desbravar o mundo comigo. Também não posso esquecer dos amigos que também dividiram república, o Guilherme “Daz Art” Siqueli, Michael “Vampeta” e Leandro “Lê Batera”.

Pelo aprendizado, agradeço aos professores Rodrigo Cunha, Leonardo Steil, Mirela de Sairre, Giselle Cerchiaro, Hugo Suffredini, Ivanise Gauber, Pablo Fiorito, Álvaro Takeo, Erik Bastos, Kleber Thiago, Laura Paulucci, João Carlos “Joca”, Adriano Benvenho, e em especial a professora Gislaine Delbianco, que foi responsável por mostrar a beleza da química ainda no ensino médio, professora Mariselma pelos ensinamentos e principalmente a paciência para comigo e ao professor Bruno Lemos pela amizade, paciência e não ter desistido de mim.

Aos funcionários Deonete, Carlão, Neli Oshiro, A todos os Professores e Funcionários da Universidade Federal do ABC, pela dedicação ao trabalho e cuidado com cada aluno.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	13
2.1 Histórico e importância dos Materiais de Referência na química analítica .....	13
2.2 Produção de Materiais de Referência.....	14
2.3 Importância da matriz de tecido animal.....	15
2.4 Elementos Essenciais e com Potencial Toxicidade.....	15
2.5 Interferências em ICP-MS.....	18
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	20
<b>4. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	20
4.1 Instrumentação .....	20
4.2 Reagentes e Soluções .....	21
4.3 Procedimento de preparação das amostras.....	22
4.4 Estudo da homogeneidade.....	23
4.5 Estudo Estatístico.....	23
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	24
5.1 Resultados analíticos dos MR e MRC.....	24
5.2 Estudo da homogeneidade .....	25
5.3 Massa mínima para análise .....	28
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	30
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	30

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1:</b> Avaliação da homogeneidade no frasco (in bottle) do candidato a MR. (—) Valor médio da concentração; (---) Intervalo de confiança $1\sigma$ de 68,26% e $2\sigma$ de 95,44%	<b>27</b>
<b>Figura 2:</b> Avaliação da Massa Mínima para análise do candidato a MR	<b>29</b>
<b>Tabela 1:</b> Interferências isobáricas e poliatômicas em ICP-MS dos isótopos dos elementos em estudo com sua respectiva abundância	<b>20</b>
<b>Tabela 2:</b> Condições operacionais utilizadas para o ICP-MS	<b>21</b>
<b>Tabela 3:</b> Concentrações de referência dos elementos constituintes no MR Soja x concentração obtida durante o estudo	<b>24</b>
<b>Tabela 4:</b> Concentrações de referência dos elementos constituintes no MR Atum x concentração obtida durante o estudo	<b>24</b>
<b>Tabela 5:</b> Concentrações de referência dos elementos constituintes no MRC Egg x concentração obtida durante o estudo	<b>25</b>
<b>Tabela 6:</b> Avaliação da homogeneidade entre frascos (between bottle) do candidato a MR	<b>25</b>
<b>Tabela 7:</b> Concentrações de referência dos elementos constituintes no MRC Whole Egg 8415	<b>26</b>

## RESUMO

Rodrigues, G. **Estudo da homogeneidade para As, Cd, Co, Cu, Fe, Pb, Se e Zn em material de referência de tecido animal candidato a certificação.** 2017. 36 pg. Trabalho de Conclusão de Curso – Bacharelado em Química. Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC, Santo André.

Este trabalho descreve o estudo da homogeneidade para um candidato a material de referência biológico - tecido animal, fígado de ovelha - que está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto – USP sob o protocolo nº 09.1.873.53.5. Dentre os parâmetros que devem ser cuidadosamente avaliados em MR de sólidos destacam-se a homogeneidade e esta é totalmente dependente da massa de amostra utilizada para análise. Esse comportamento pode ser explicado pela diminuição da probabilidade de encontrar a mesma concentração média de uma determinada espécie em uma pequena porção, de modo que a amostra tende a se tornar cada vez mais heterogênea a medida que é subdividida em frações menores. O emprego de massas inferiores ao valor estabelecido nos certificados tende a comprometer a homogeneidade da amostra e afetar a representatividade, pois os analitos podem não estar homogeneamente distribuídos no material. Assim, a avaliação da homogeneidade de um candidato a MR é imprescindível, e é uma importante etapa no processo de produção. Para as análises, foram escolhidas aleatoriamente, 2 dentre 10 frascos do candidato a MR e foram pesados, em triplicata, alíquotas de 50, 100, 200 e 400 mg. A validação dos resultados foi realizada por meio da análise de materiais de referência certificado (*Whole Egg Powder* - Reference Material 8415) do *National Institute of Standard and Technology*. Os resultados obtidos para As, Cd, Co, Cu, Fe, Pb, Se e Zn indicam homogeneidade adequada do material candidato a MR, visto que as concentrações desses elementos no frasco são estatisticamente equivalentes em um limite de confiança de 95,44% e com massa mínima de análise de 50 mg. A média para o Arsênio foi de  $592 \pm 35,6 \text{ ng.g}^{-1}$ , Cádmio  $1,75 \pm 0,094 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$ , Cobalto  $451 \pm 27,1 \text{ ng.g}^{-1}$ , Cobre  $390 \pm 14 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$ , Ferro  $362 \pm 21,7 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$ , Chumbo  $1,94 \pm 0,15 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$ , Selênio  $2,45 \pm 0,014 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$  e Zinco  $119 \pm 6,7 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$ . A variação em torno das medidas esteve abaixo de 8%, um valor aceitável para amostras biológicas, que de acordo com Feinberg et al (2004) é de 15%. No entanto para As e Se, houve interferências que ocasionaram erros no sinal analítico, necessitando de uma nova análise utilizando cela de reação dinâmica (DRC), que é um equipamento versátil para a eliminação de interferentes, dado a oportunidade de escolha de vários gases de reação como Xe, CH<sub>4</sub>, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, He, e mistura H<sub>2</sub>:Ar (1:9 v/v), injetados no interior do DRC. Ele está localizado na câmara de vácuo entre o cilindro de lentes iônicas e o quadrupolo. Portanto o MR candidato está apto a seguir para avaliação de estabilidade, e apto a certificação, finalmente tornando-se um MRC e assim ser utilizado no controle e garantia de qualidade de resultados e em calibrações para amostras de matriz biológica.

**Palavras chave:** materiais de referência, massa mínima, elementos traço, ICP-MS, homogeneidade.

## ABSTRACT

Rodrigues, G. **Study of homogeneity for As, Cd, Co, Cu, Fe, Pb, Se and Zn in animal tissue reference material candidate for certification.** 2017. 36 pg. Trabalho de Conclusão de Curso – Bacharelado em Química. Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC, Santo André.

This work describes the study of homogeneity for a candidate for biological reference material - animal tissue, sheep liver - which is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation adopted by the Commission of Ethics of Animals (CEUA) of the Ribeirão Preto Campus - USP under protocol no. 09.1.873.53.5. Among the parameters that must be carefully evaluated in solid MR, the homogeneity stands out and is dependent on the sample mass used for analysis. This behavior can be explained by the decrease in the probability of finding the same average concentration of a given species in a small portion. Therefore, the sample tends to become increasingly heterogeneous as it is subdivided into smaller fractions. The use of masses lower than the value established in the certificates tends to compromise the homogeneity of the sample and affect the representativity, once the analytes may not be homogeneously distributed in the material. Thus, the assessment of the homogeneity of an MRI candidate is essential, and is an important step in the production process. For the analysis, 2 from 10 flasks of the MR candidate were randomly selected and aliquots of 50, 100, 200 and 400 mg were weighed in triplicate. Results were validated using Whole Egg Powder (Reference Material 8415), a reference material produced by National Institute of Standard and Technology. The results obtained for As, Cd, Co, Cu, Fe, Pb, Se and Zn indicate the appropriate homogeneity of the candidate material for MR, because in the concentrations of these elements in the flask are statistically equivalent at a confidence limit of 95.44% and with a minimum analysis mass of 50 mg. The average for Arsenic was  $592 \pm 35.6 \text{ ng.g}^{-1}$ , Cadmium  $1.75 \pm 0.094 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$ , Cobalt  $451 \pm 27.1 \text{ ng.g}^{-1}$ , Copper  $390 \pm 14 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$ , Iron  $362 \pm 21.7 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$ , Lead  $1.94 \pm 0.15 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$ , Selenium  $2.45 \pm 0.014 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$  and Zinc  $119 \pm 6.7 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$ . The variation around the measurements was below 8%, an acceptable value for biological samples, which according to Feinberg et al (2004) is 15%. However for As and Se, there were interferences that caused errors in the analytical signal, requiring a new analysis using a dynamic reaction cell (DRC), which is a versatile equipment for the elimination of interferences, given the opportunity to choose several gases of reaction as Xe, CH<sub>4</sub>, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, He, and mixture H<sub>2</sub>:Ar (1:9 v/v), injected into the DRC. It is located in the vacuum chamber between the ionic lens cylinder and the quadrupole. Therefore, the material is able to proceed to the next steps: stability and certification. Finally becoming an MRC and thus can be used in the control and quality assurance of results and in calibrations for biological matrix samples.

**Key words:** reference material, minimal mass, trace elements, ICP-MS, homogeneity.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ACGIH:** Conferência Americana da Indústria Higienista, do inglês: American Conference of Industrial Hygienists

**BCR:** Escritório Comunitário de Referência, do inglês: Community Bureau of Reference

**CENA:** Centro de Energia Nuclear na Agricultura

**CETEM:** Centro de Tecnologia Mineral

**CEUA:** Comissão de Ética no Uso de Animais

**CRM:** Material de Referência Certificado, do inglês: Certified Reference Material.

**DRC:** Cella de Reação Dinâmica, do inglês: Dynamic Reaction Cell

**EMBRAPA:** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

**IAEA:** Agência internacional de energia atômica, do inglês: International Atomic Energy Agency

**IARC:** Agência Internacional de Investigação sobre o Câncer, do inglês: International Agency for Research on Cancer

**ICP-MS:** Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês: Inductively Coupled Plasma Mass spectrometry

**INMETRO:** Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

**IPEN:** Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

**IPT:** Instituto de Pesquisas Tecnológicas

**IRMM:** Instituto de Materiais e Medições de Referência, do inglês: Institute for Reference Materials and Measurements

**LANAGRO:** Laboratório Agropecuário

**NBS:** Secretaria Nacional de Normas, do inglês: National Bureau of Standards

**NIES:** Instituto Nacional de Estudos Ambientais, do inglês: National Institute for Environmental Studies

**NIST:** Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia National, do inglês: Institute of Standards and Technology

**NRCC:** Conselho Nacional de Pesquisa Canadá, do inglês: National Research Council Canada

**NRCCRM:** Centro Nacional Chinês de Pesquisa para MRC, do inglês: Chinese National Research Center for CRM

**NWRI:** Instituto Nacional de Investigação da Água, do inglês: National Water Research Institute

**MR:** Material de Referência, do inglês: Reference Material

**MRC:** Material de Referência Certificado, do inglês: Certified Reference Material

**SOD:** Superóxido Dismutase (Enzima)

**US EPA:** United States Environmental Protection Agency, do inglês: Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

## 1. INTRODUÇÃO

A tecnologia atual no mundo, capaz de fazer medições exatas e precisas, é uma das fundações de uma sociedade tecnologicamente avançada, e requer um grande número de materiais de referência certificados (MRC), em diversos campos, e cuja demanda tende a aumentar<sup>1,2</sup>. Com a contínua globalização da ciência, indústria e comércio, a confiabilidade e a aceitação dos resultados de medição têm-se tornado cada vez mais importantes. Nesse sentido, houve um grande aumento na demanda de análises químicas, juntamente com o desenvolvimento de métodos analíticos instrumentais mais eficientes. Dentro desse contexto, os materiais de referência (MR) desempenham um papel fundamental em todas as áreas onde resultados analíticos são necessários. Estes MR visam o controle e garantia de qualidade, a avaliação da exatidão dos métodos em desenvolvimento e validação de métodos, bem como a construção da curva analítica de calibração de instrumentos<sup>3-6</sup>.

Os materiais de referência (MR), por definição, são *materiais ou substâncias que tem um ou mais valores de propriedade, que são suficientemente homogêneos e bem estabelecidos para serem usados na calibração de um aparelho, na avaliação de um método de medição ou na atribuição de valores a materiais*. Já o material de referência certificado (MRC) são *materiais de referências, acompanhados por um certificado, com um ou mais valores de propriedades, certificados por um procedimento que estabelece sua rastreabilidade à obtenção exata da unidade na qual os valores da propriedade são expressos, com cada valor certificado acompanhado por uma incerteza para um nível de confiança estabelecido*<sup>7</sup>. Os MRCs também são conhecidos como padrões de matrizes reais, pois, regra geral, são preparados a partir de materiais naturais processados, simulando as reais condições presentes em amostras naturais<sup>8</sup>.

A elaboração de um material de referência certificado constitui um processo lento, meticuloso, dispendioso e apresenta um custo relativamente elevado devido sua complexidade de produção<sup>1,9</sup>. Nem sempre será possível satisfazer a demanda de MRC. Por esta razão, recomenda-se que os MRC sejam utilizados adequadamente, isto é, de forma eficiente e econômica<sup>1</sup>.

Durante a produção desses materiais, cuidados devem ser tomados para evitar perdas dos analitos ou contaminações, ou seja, manter a composição química do material durante o seu processo de produção<sup>10</sup>. A homogeneidade, segregação de partículas e massa mínima de amostra são os parâmetros analíticos mais avaliados, principalmente para a produção de materiais voltados à microanálise, uma vez que estão diretamente relacionados à exatidão e precisão dos resultados<sup>11</sup>.

Os progressos no conhecimento sobre as formas químicas dos elementos na medicina e na biologia têm revelado a importância dos elementos traço essenciais - Co, Cu, Fe, I, Mn, Mo, Ni,

Se, Sn, Zn - e tóxicos - As, Cd, Hg, Pb - para a saúde humana. Quantificar esses elementos em tecidos e fluidos humanos e de animais, bem como em produtos alimentícios, tornou-se prática cotidiana em laboratórios do mundo todo. A necessidade do controle adequado da segurança de alimentos e do respectivo valor nutricional refletiu-se na proposta da Comissão Europeia de criar a *European Food Authority*<sup>12</sup>, órgão europeu que supervisiona o controle de alimentos importados e produzidos pela comunidade europeia<sup>13</sup>. Como consequência, houve aumento na demanda pelo desenvolvimento de novos métodos de análise e por MR<sup>14</sup>.

O presente trabalho é passo fundamental na produção de MRs. As contribuições deste estudo estão na avaliação da homogeneidade de MRs candidatos a certificação. Após todas as etapas de produção e de certificação (cuidado com os animais, liofilização dos tecidos, moagem, tamização, homogeneização, envase, esterilização por raios gama, avaliação da homogeneidade, estabilidade, distribuição para ensaios de proficiência, análise estatística dos ensaios) o material estará apto a ser utilizado como um MRC para controle e monitoramento de análises químicas para elementos traços especialmente para alimentos cárneos, sua matriz de origem.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Histórico e importância dos Materiais de Referência na química analítica

Os primeiros MR que se tem notícia surgiram no final do século 19, como forma de averiguar produtos adulterados e tem consenso nas análises de diversos laboratórios. Porém a produção de MRC só iniciou de fato em 1901, quando o *National Institute of Standards and Technology* (NIST antigo NBS - *National Bureau of Standards*), iniciou a produção de materiais de referência para atender o setor industrial, que vinha em acelerado crescimento e conseqüentemente, aumentando a demanda por padrões. Inicialmente produziu 4 MR em aço, e em 1951 já contavam com mais de 540 MR<sup>15-17</sup>.

Após os anos 1960 iniciou efetivamente a produção de MR de matrizes biológicas pelo NIST e pela *International Atomic Energy Agency* (IAEA), situada em Viena<sup>15,16</sup>. A partir de 1970 houve um crescente estudo e produção de MR de matriz biológica e ambiental, pelas mais diversas organizações como *US Food and Drug Administration*, *US department of Agriculture*, *Agriculture Canada*, *National Research Council Canada* (NRCC), *National Water Research Institute* (NWRI), *Japanese National Institute for Environmental Studies* (NIES), *Institute for Reference Materials and Measurements* (IRMM), *Chinese National Research Center for CRM* (NRCCRM), entre outras<sup>15</sup>.

No Brasil a pesquisa e produção de MR 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)<sup>18</sup>. O IPT é o mais antigo instituto de metrologia do

país, e a exemplo dos primeiros MR produzidos pelo NIST, é responsável pela produção de MR de ligas metálicas, minérios e óleos minerais, enquanto o Instituto de Metrologia, Normalização e Controle da Qualidade Industrial (INMETRO) produz MRs puros e alguns de matriz, com destaque para o MR de cachaça, que é um produto de exportação nacional<sup>19</sup>. Outras instituições como o Centro de Tecnologia Mineral (CETEM) produz padrões de bauxita, minério de sulfetos de cobre e concentrado de sulfetos de cobre<sup>20</sup>, Fundação Instituto Oswaldo Cruz, IPEN - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Laboratório Agropecuário (LANAGRO), Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA-USP), entre outros, também estão com a produção de MRs.

Na área de matrizes biológica dos MRs, o Brasil só teve início em a partir de 1982 pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade na Saúde (INCQS) - Fundação Oswaldo Cruz/Ministério da Saúde, com um programa voltado ao controle de qualidade de produtos sujeitos à vigilância sanitária e controle de qualidade de conjuntos de diagnósticos<sup>21</sup>.

## *2.2. Produção de Materiais de Referência*

A certificação de MR é de grande importância, pois atribui um valor às propriedades de interesse para o usuário, que servirão de instrumentos para conferir a rastreabilidade a resultados analíticos gerados nos processos<sup>22</sup>.

Segundo Chui et al. (2005)<sup>8</sup>, as quatro etapas básicas do processo de produção de MRs sólidos consistem em preparar o material na granulometria desejada, distribuí-lo em frascos, verificar a homogeneidade do material nos frascos, fazer o teste para estabelecer o tempo de estabilidade que poderá ser garantido ao material embalado e a ser mantido em estoque e, finalmente, a certificação dos valores a serem atribuídos às propriedades de interesse do material preparado.

Um dos parâmetros essenciais para a certificação de MR, que deve ser cuidadosamente estudado, é a homogeneidade do material e intrinsecamente, sua massa mínima. Como a homogeneidade é totalmente dependente da massa da amostra utilizada para análise, explicada pela diminuição da probabilidade de encontrar a mesma concentração média de uma determinada espécie na pequena porção fracionada, cada vez que a amostra é subdividida, ela se torna mais heterogênea<sup>23,24</sup>. Então a obtenção de resultados precisos e exatos com massas inferiores a 100 mg podem comprometer a representatividade, tanto por erros associados às pesagens como também pela falta de homogeneidade para alguns elementos<sup>10</sup>. Os materiais de referência certificados (MRC) disponíveis atualmente garantem a representatividade para massas de amostras acima de 100 ou 500 mg<sup>25</sup>.

O planejamento do experimento para verificar a homogeneidade de um lote de material preparado para fins de certificação deve indicar as variabilidades devido a amostras dentro de frascos e as variabilidades de amostras entre os frascos<sup>26,27</sup>, que contêm os materiais que compõem o lote, devidamente envasados. A questão comum a ser estudada é distinguir os efeitos de heterogeneidade do material dos efeitos devido às variabilidades intrínsecas às próprias medições.

### *2.3.Importância da matriz de tecido animal*

Quando novos métodos de análise são desenvolvidos e aplicados em um MRC e os resultados estão concordantes com os valores certificados, pode-se assumir que esse novo método é exato. Segundo M. Segura et.al (2004)<sup>28</sup>, a falta de exatidão em baixas concentrações de elementos tóxicos, como As, Se, Cr, Ni e Pb, pode ser atribuída à sensibilidade de alguns métodos analíticos, à precisão dos métodos e à complexidade da matriz. Essa complexidade da matriz, gerando interferências matriciais, desenvolveu duas formas de obtenção de medições químicas confiáveis e comparáveis, isto é, os materiais de referência de matrizes análogas e comparações interlaboratoriais<sup>29</sup>. Logo, verificar a exatidão de um método exige o emprego de um MRC com matriz análoga à matriz amostra<sup>30</sup>.

Por esse motivo, o desenvolvimento de MR e MRC de tecido animal é necessário, não só para a medição total elementar, mas também para a medição de espécies químicas, na avaliação da contaminação ambiental devido à sua capacidade de bioacumular elementos potencialmente tóxicos como As, Cd e Pb, dentre outros.

Pode-se observar comparando diferentes métodos de preparo de amostra, como por exemplo solo e alimentos. No procedimento descrito por Nardi E.P. et al. (2009)<sup>31</sup>, amostras de alimentos entre 100 a 250 mg, foram digeridas com 4 ml de ácido nítrico 14 mol.L<sup>-1</sup> mais 2 ml de peróxido de hidrogênio 30% em volume. Já com amostras de solo, descrita por Dolan, R. et. al (1990)<sup>32</sup>, 250 mg de amostra foram digeridas com 4 ml de HF, 0,5 ml de HClO<sub>4</sub> e 3 ml de HNO<sub>3</sub> concentrado. Os resultados obtidos para o elemento Pb, por exemplo, no trabalho descrito por Nardi et al (2009)<sup>31</sup> foi de 390 ng.g<sup>-1</sup> enquanto no trabalho de Dolan et al (1990)<sup>32</sup> foram encontrados valores acima 14000 mg.kg<sup>-1</sup>. Tendo em vista esses resultados, as amostras de alimentos, por ter menor concentração de elementos traço, não é viável a utilização de muitos reagentes para a sua digestão, evitando assim, brancos com sinais altos.

### *2.4.Elementos Essenciais e com Potencial Toxicidade*

"Os elementos traços são mais importantes para a vida que as vitaminas. São mais críticos

porque não podem ser sintetizados mas têm que ocorrer no ambiente em faixas de concentrações muito limitadas”<sup>33</sup>.

Dos 118 elementos na tabela periódica, 94 são naturais, sendo 84 metais<sup>34,35</sup>. Pode-se considerar que podem ocorrer infinitas possibilidades de contaminação ambiental, entretanto, como ocorre de maneira natural, não deve ser considerada como perigosa fazendo parte do equilíbrio do ecossistema. Apesar de sua toxicidade, alguns metais ocorrem na natureza de maneira escassa, o que não confere uma ameaça real à saúde e ao ambiente<sup>36</sup>.

No meio ambiente são lançadas inúmeras substâncias tóxicas, onde os metais tóxicos se destacam nos estudos relativos à exposição ocupacional, contaminação em alimentos e corpos d’água, por suas características de toxicidade e bioacumulação, o que representa sérios riscos à saúde<sup>37</sup>.

Atualmente, cerca de 25 elementos são reconhecidos como essenciais para a vida humana, sendo que 11 deles (Co, Cu, Cr, I, Mn, Mo, Ni, Se, Si, V e Zn) estão presentes em baixas concentrações (menos de 7 g em um indivíduo de 70 kg) e, por isso, são denominados elementos traço<sup>38,39</sup>. Grande parte desses elementos, como o cobre, zinco, selênio, são responsáveis pela síntese, funcionamento e manutenção de linfócitos presentes no sistema imunológico<sup>40</sup>. Em contrapartida, existem os elementos com efeitos tóxicos como, por exemplo, o cádmio, chumbo e mercúrio<sup>41</sup>. No entanto, a toxicidade de qualquer elemento dependerá de sua concentração, período e nível de exposição como também da forma química, isto é, das espécies químicas do elemento presentes no indivíduo<sup>42</sup>.

Conforme P.A. Paracelso (1493- 1541): “Todas as coisas são venenosas e nada é venenoso; é só uma questão de dosagem”<sup>43</sup>.

Os elementos químicos em estudo neste trabalho são relevantes do ponto de vista toxicológico e nutricional. Portanto, os aspectos toxicológicos-nutricionais mais relevantes destes elementos serão apresentados a seguir.

### *Elementos Essenciais*

O cobalto na forma de cobalamina é um componente essencial da vitamina B12, necessária para produção de células vermelhas e prevenção da anemia perniciosa. O excesso de cobalto pode provocar diarreia, vômito, aumento da pressão sanguínea, cardiomiopatias<sup>44</sup>.

O cobre é necessário para o desenvolvimento do tecido conjuntivo, formação dos nervos e dos ossos. Também participa do metabolismo do ferro e carboidratos. A deficiência de cobre no homem é rara<sup>45</sup>.

Já o ferro é o mais importante dos elementos essenciais. Um adulto possui cerca de 4g de

Fe em sua massa corporal onde, 75% desse total está na forma de hemoglobina, responsáveis pelo transporte de oxigênio<sup>46</sup>. A deficiência de ferro causa anemia; já a intoxicação crônica está associada a doenças genéticas ou metabólicas<sup>47</sup>.

A ação antioxidante do selênio indica que este elemento pode desempenhar um importante papel na prevenção do câncer. A deficiência de selênio, além de aumentar a probabilidade do desenvolvimento de certos tipos de câncer, está associada a uma patologia observada na China, devido às baixas concentrações de selênio no solo daquela região: a doença de Keshan<sup>38</sup>. Já em elevadas concentrações no organismo o selênio torna-se um elemento tóxico. Devido a sua similaridade química com o enxofre, o selênio pode interferir no metabolismo dos compostos que contêm enxofre, alterando a estrutura de proteínas como a queratina, resultando em mudanças estruturais nos cabelos e unhas<sup>48</sup>.

O zinco é um cofator indispensável que compõe mais de 100 enzimas presentes nos mamíferos, como a enzima SOD presente no citosol. Ele está envolvido nos processos de divisão celular, crescimento, cicatrização, regulação do metabolismo e do sistema imunológico<sup>38,48</sup>. O zinco atua também no metabolismo de glucose<sup>49</sup>. Assim, elevadas doses de zinco podem causar hiperglicemia, além de afetar o intestino e o fígado<sup>48</sup>.

#### *Elementos com Potencial Toxicidade*

O arsênio pode ser absorvido por todas as vias, mas a via oral é a principal (90%) sendo que, por inalação, de 25 a 40% do que é inalado deposita-se nos pulmões<sup>50</sup>. A exposição por via oral é mais comum devido à sua presença em organismos marinhos utilizados como alimentos (arsenobetaína, arsenocolina e arseno-açúcares)<sup>51,52,53</sup>. Arsenobetaína e arsenocolina, encontradas em alimentos de origem marinha, não são biotransformadas, sendo excretadas inalteradas na urina. A sintomatologia da exposição aguda ao arsênio é a mesma para derivados orgânicos e inorgânicos: quadro gastroenterítico grave com início após 30 minutos de exposição.

O arsênio e seus compostos são reconhecidos pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) e pela *American Conference of Industrial Hygienists* (ACGIH) como carcinogênico humano<sup>54,55</sup>.

Já o cádmio, a principal via de absorção é a respiratória, sendo que cerca de 55% do cádmio depositado nos pulmões é absorvido<sup>56</sup>. Na avaliação da exposição a este elemento é imprescindível considerar o tabagismo, pois se calcula que de 20 a 50% do cádmio proveniente do cigarro seja absorvido<sup>57</sup>. A meia vida biológica do cádmio no organismo é calculada entre 17 e 38 anos<sup>58</sup> e a exposição crônica pode levar a lesões ósseas (devido à competição do cádmio com o cálcio), enfisema pulmonar, nefrite, proteinúria e grande potencial de

cardiotoxicidade<sup>56,59</sup>. O cádmio e seus compostos são reconhecidos pela IARC como carcinogênico humano<sup>59</sup> e pela ACGIH como suspeito carcinogênico humano<sup>55</sup>.

O chumbo e seus compostos são utilizados na indústria de baterias, munições, tintas, vernizes, gasolina, pigmentos equipamentos contra radiação, soldas, vidros e cerâmica<sup>60</sup>. A principal via de absorção do chumbo é a respiratória. No pulmão, ele é absorvido sob a forma de fumos ou partículas finas que são fagocitadas. A absorção por via oral depende da solubilidade e do tamanho das partículas<sup>56</sup>. Acumula-se nos ossos (90%, com substituição do cálcio ósseo), dentes, fígado, pulmões, rins, cérebro e baço. A vida média do chumbo no sangue varia de 25 a 36 dias, nos tecidos moles cerca de 40 dias e nos ossos cerca de 27 anos<sup>61</sup>. Os sintomas da intoxicação por exposição aguda são encefalopatia aguda com insuficiência renal, sintomas gastrointestinais graves e hemólise<sup>60</sup>.

O chumbo inorgânico e seus compostos são reconhecidos pela IARC como carcinogênicos para o homem, já os compostos de chumbo orgânico são reconhecidos como não carcinogênicos para o ser humano<sup>62</sup>. A ACGIH reconhece o chumbo e seus compostos inorgânicos como carcinogênico para animais confirmado com relevância desconhecida para seres humanos<sup>55</sup>. Já a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA) considera o chumbo como provável carcinogênico humano<sup>60</sup>.

### 2.5. Interferências em ICP-MS

Embora o ICP-MS seja uma poderosa técnica na determinação de elementos traço, um dos seus maiores problemas é sua suscetibilidade a interferências, que são divididas em dois grupos: físicas e espectrais<sup>66</sup>.

As interferências de natureza física estão relacionadas com as propriedades das amostras, como viscosidade, tensão superficial e densidade, além dos sólidos dissolvidos que podem interferir no método de introdução e na ionização da amostra no plasma<sup>66,70</sup>. Existem diversos métodos aplicados para detectar e eliminar este tipo de interferência através da diluição da amostra, porém o analito também é diluído, simulação de matriz (*matrix matching*), separação do analito da amostra<sup>71</sup> e técnicas de calibração como adição de padrão<sup>72</sup>, diluição isotópica<sup>73</sup> e padronização interna<sup>74,75,76</sup>.

Podem ocorrer também efeitos de supressão do sinal onde um excesso de elementos facilmente ionizáveis, presentes na matriz, poderá causar a supressão do sinal do analito e, em alguns casos, o aumento do sinal<sup>77</sup>.

Uma das interferências físicas observadas para ICP-MS é o efeito de memória, oriundo do

lento decaimento do sinal para um nível de até 0,1% do sinal total quando a solução do analito é substituída pelo branco. Este efeito é devido principalmente ao excesso de analito proveniente das paredes da câmara de nebulização e da vidraria associada, tornando-se pior para os componentes mais voláteis da solução, tais como os compostos de Pb, Cd, Li, I e principalmente o Hg; compostos refratários são menos propensos a este efeito. Outra interferência física é a deposição de sal ou carbono nos cones de amostragem e no skimmer, causando obstrução dos orifícios, afetando substancialmente o processo de amostragem. Estas interferências são geradas pela introdução de amostras com alto teor de sólidos dissolvidos ou compostos orgânicos, os quais podem afetar também a eficiência de ionização. O nível de tolerância para o teor de sólidos dissolvidos é de 0,2% para uma análise em ICP-MS<sup>78</sup>.

Já as interferências espectrais são originadas a partir de íons atômicos e moleculares que possuem a mesma razão massa/carga que o analito de interesse, causando um aumento errôneo no sinal do mesmo. Esse tipo de interferência se deve à formação de íons de óxidos e dupla carga, à sobreposição isobárica, além de íons poliatômicos<sup>66,79,80</sup>. Esse tipo de interferência ocorre principalmente para elementos que possuem razão massa/carga abaixo de 84<sup>70,81-83</sup> e podem ser divididas em dois grupos: interferências isobáricas e interferências poliatômicas, na Tabela 1 encontram-se alguns exemplos.

As interferências isobáricas ocorrem quando um isótopo de um elemento sobrepõe a leitura de um isótopo de outro elemento com a mesma massa nominal<sup>70</sup>. As interferências poliatômicas são formadas a partir de moléculas ionizadas que são produzidas nas altas temperaturas do plasma ou na região de interface entre o plasma e os filtros de massa<sup>67</sup>. Esses íons poliatômicos podem interferir com alguns isótopos de mesma massa nominal e são produzidos a partir do Ar(g) e outros gases (O<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>), de reagentes utilizados no tratamento das amostras (como o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HCl, HF) ou da própria matriz da amostra (sais e íons)<sup>67,79</sup>.

Tabela 1: Interferências isobáricas e poliatômicas em ICP-MS dos isótopos dos elementos em estudo com sua respectiva abundância

Isótopos	Abundância	Interferentes
<sup>75</sup> As	100	<sup>40</sup> Ar <sup>35</sup> Cl <sup>+</sup> , <sup>59</sup> Co <sup>16</sup> O <sup>+</sup> , <sup>36</sup> Ar <sup>38</sup> Ar <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>38</sup> Ar <sup>37</sup> Cl <sup>+</sup> , <sup>36</sup> Ar <sup>39</sup> K <sup>+</sup> , <sup>43</sup> Ca <sup>16</sup> O <sub>2</sub> , <sup>23</sup> Na <sup>12</sup> C <sup>40</sup> Ar, <sup>12</sup> C <sup>31</sup> P <sup>16</sup> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>
<sup>112</sup> Cd	24,1	<sup>40</sup> Ca <sub>2</sub> <sup>16</sup> O <sub>2</sub> <sup>+</sup> , <sup>40</sup> Ar <sub>2</sub> <sup>16</sup> O <sub>2</sub> <sup>+</sup> , <sup>96</sup> Ru <sup>16</sup> O <sup>+</sup>
<sup>113</sup> Cd	12,22	<sup>96</sup> Zr <sup>16</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>40</sup> Ca <sub>2</sub> <sup>16</sup> O <sub>2</sub> <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>40</sup> Ar <sub>2</sub> <sup>16</sup> O <sub>2</sub> <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>96</sup> Ru <sup>17</sup> O <sup>+</sup>
<sup>114</sup> Cd	28,7	<sup>98</sup> Mo <sup>16</sup> O <sup>+</sup> , <sup>98</sup> Ru <sup>16</sup> O <sup>+</sup>
<sup>59</sup> Co	100	<sup>43</sup> Ca <sup>16</sup> O <sup>+</sup> , <sup>42</sup> Ca <sup>16</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>24</sup> Mg <sup>35</sup> Cl <sup>+</sup> , <sup>36</sup> Ar <sup>23</sup> Na <sup>+</sup> , <sup>40</sup> Ar <sup>18</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>40</sup> Ar <sup>19</sup> F <sup>+</sup>
<sup>63</sup> Cu	69,1	<sup>31</sup> P <sup>16</sup> O <sub>2</sub> <sup>+</sup> , <sup>40</sup> Ar <sup>23</sup> Na <sup>+</sup> , <sup>47</sup> Ti <sup>16</sup> O <sup>+</sup> , <sup>23</sup> Na <sup>40</sup> Ca <sup>+</sup> , <sup>46</sup> Ca <sup>16</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>36</sup> Ar <sup>12</sup> C <sup>14</sup> N <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>14</sup> N <sup>12</sup> C <sup>37</sup> Cl <sup>+</sup> , <sup>16</sup> O <sup>12</sup> C <sup>35</sup> Cl <sup>+</sup>
<sup>65</sup> Cu	30,9	<sup>49</sup> Ti <sup>16</sup> O <sup>+</sup> , <sup>32</sup> S <sup>16</sup> O <sub>2</sub> <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>40</sup> Ar <sup>25</sup> Mg <sup>+</sup> , <sup>40</sup> Ca <sup>16</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>36</sup> Ar <sup>14</sup> N <sub>2</sub> <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>32</sup> S <sup>33</sup> S <sup>+</sup> , <sup>32</sup> S <sup>16</sup> O <sup>17</sup> O <sup>+</sup> , <sup>33</sup> S <sup>16</sup> O <sub>2</sub> <sup>+</sup> , <sup>12</sup> C <sup>16</sup> O <sup>37</sup> Cl <sup>+</sup> , <sup>12</sup> C <sup>18</sup> O <sup>35</sup> Cl <sup>+</sup> , <sup>31</sup> P <sup>16</sup> O <sup>18</sup> O <sup>+</sup>
<sup>54</sup> Fe	5,82	<sup>37</sup> Cl <sup>16</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>40</sup> Ar <sup>14</sup> N <sup>+</sup> , <sup>38</sup> Ar <sup>15</sup> N <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>36</sup> Ar <sup>18</sup> O <sup>+</sup> , <sup>38</sup> Ar <sup>16</sup> O <sup>+</sup> , <sup>36</sup> Ar <sup>17</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>36</sup> S <sup>18</sup> O <sup>+</sup> , <sup>35</sup> Cl <sup>18</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>37</sup> Cl <sup>17</sup> O <sup>+</sup>
<sup>56</sup> Fe	91,66	<sup>40</sup> Ar <sup>16</sup> O <sup>+</sup> , <sup>40</sup> Ca <sup>16</sup> O <sup>+</sup> , <sup>40</sup> Ar <sup>15</sup> N <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>38</sup> Ar <sup>18</sup> O <sup>+</sup> , <sup>38</sup> Ar <sup>17</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>37</sup> Cl <sup>18</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup>
<sup>57</sup> Fe	2,19	<sup>40</sup> Ar <sup>16</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>40</sup> Ca <sup>16</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>40</sup> Ar <sup>17</sup> O <sup>+</sup> , <sup>38</sup> Ar <sup>18</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>38</sup> Ar <sup>19</sup> F <sup>+</sup>
<sup>206</sup> Pb	24,1	<sup>190</sup> Pt <sup>16</sup> O <sup>+</sup>
<sup>208</sup> Pb	52,4	<sup>192</sup> Pt <sup>16</sup> O <sup>+</sup>
<sup>80</sup> Se	49,82	<sup>40</sup> Ar <sub>2</sub> <sup>+</sup> , <sup>32</sup> S <sup>16</sup> O <sub>3</sub> <sup>+</sup>
<sup>82</sup> Se	9,19	<sup>12</sup> C <sup>35</sup> Cl <sub>2</sub> <sup>+</sup> , <sup>34</sup> S <sup>16</sup> O <sub>3</sub> <sup>+</sup> , <sup>40</sup> Ar <sub>2</sub> <sup>1</sup> H <sub>2</sub> <sup>+</sup>
<sup>64</sup> Zn	48,89	<sup>32</sup> S <sup>16</sup> O <sub>2</sub> <sup>+</sup> , <sup>48</sup> Ti <sup>16</sup> O <sup>+</sup> , <sup>31</sup> P <sup>16</sup> O <sub>2</sub> <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>48</sup> Ca <sup>16</sup> O <sup>+</sup> , <sup>32</sup> S <sub>2</sub> <sup>+</sup> , <sup>31</sup> P <sup>16</sup> O <sup>17</sup> O <sup>+</sup> , <sup>34</sup> S <sup>16</sup> O <sub>2</sub> <sup>+</sup> , <sup>36</sup> Ar <sup>14</sup> N <sub>2</sub> <sup>+</sup>
<sup>66</sup> Zn	27,81	<sup>50</sup> Ti <sup>16</sup> O <sup>+</sup> , <sup>34</sup> S <sup>16</sup> O <sub>2</sub> <sup>+</sup> , <sup>33</sup> S <sup>16</sup> O <sub>2</sub> <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>32</sup> S <sup>16</sup> O <sup>18</sup> O <sup>+</sup> , <sup>32</sup> S <sup>17</sup> O <sub>2</sub> <sup>+</sup> , <sup>33</sup> S <sup>16</sup> O <sup>17</sup> O <sup>+</sup> , <sup>32</sup> S <sup>34</sup> S <sup>+</sup> , <sup>33</sup> S <sub>2</sub> <sup>+</sup>
<sup>67</sup> Zn	4,11	<sup>35</sup> Cl <sup>16</sup> O <sub>2</sub> <sup>+</sup> , <sup>33</sup> S <sup>34</sup> S <sup>+</sup> , <sup>34</sup> S <sup>16</sup> O <sub>2</sub> <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>32</sup> S <sup>16</sup> O <sup>18</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>33</sup> S <sup>34</sup> S <sup>+</sup> , <sup>34</sup> S <sup>16</sup> O <sup>17</sup> O <sup>+</sup> , <sup>33</sup> S <sup>16</sup> O <sup>18</sup> O <sup>+</sup> , <sup>32</sup> S <sup>17</sup> O <sup>18</sup> O <sup>+</sup> , <sup>33</sup> S <sup>17</sup> O <sub>2</sub> <sup>+</sup> , <sup>35</sup> Cl <sup>16</sup> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>
<sup>68</sup> Zn	18,57	<sup>36</sup> S <sup>16</sup> O <sub>2</sub> <sup>+</sup> , <sup>34</sup> S <sup>16</sup> O <sup>18</sup> O <sup>+</sup> , <sup>40</sup> Ar <sup>14</sup> N <sub>2</sub> <sup>+</sup> , <sup>35</sup> Cl <sup>16</sup> O <sup>17</sup> O <sup>+</sup> , <sup>34</sup> S <sub>2</sub> <sup>+</sup> , <sup>36</sup> Ar <sup>32</sup> S <sup>+</sup> , <sup>34</sup> S <sup>17</sup> O <sub>2</sub> <sup>+</sup> , <sup>33</sup> S <sup>17</sup> O <sup>18</sup> O <sup>+</sup> , <sup>32</sup> S <sup>18</sup> O <sub>2</sub> <sup>+</sup> , <sup>32</sup> S <sup>36</sup> S <sup>+</sup>

(Reproduzido de MAY e WIEDMEYER, 1998)

### 3. OBJETIVOS

Estudar a homogeneidade para As, Cd, Co, Cu, Fe, Pb, Se e Zn em material de referência de tecido animal, fígado de ovelha, candidato a certificação usando espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado – ICP-MS.

### 4. PARTE EXPERIMENTAL

#### 4.1. Instrumentação

Para a abertura/digestão das amostras, a pesagem foi realizada em balança analítica (Ohaus, PA214CP, USA). Foram utilizados tubos (Falcon, Corning, Tamaulipas, México), e forno de micro-ondas (Easy, Milestone, Itália) para decomposição ácida das amostras. Foi utilizado um espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (Agilent 7900, Hachioji, Japão) operado com argônio 99,996% (White-Martins, Brasil). Condições operacionais utilizadas para o ICP-MS estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2: Condições operacionais utilizadas para o ICP-MS

Isótopos monitorados (Limite de detecção instrumental -ng ml <sup>-1</sup> )	<sup>75</sup> As (0.017), <sup>114</sup> Cd (0.006), <sup>59</sup> Co (0.002), <sup>63</sup> Cu (0.021), <sup>57</sup> Fe (0.230), <sup>208</sup> Pb (0.003), <sup>82</sup> Se (0.026), <sup>64</sup> Zn (0.322)
Padrão Interno	<sup>89</sup> Y e <sup>115</sup> In (10 ng ml <sup>-1</sup> )
Potência de Rádio-frequência	1550W
Vazão de argônio	15 L min <sup>-1</sup>
Vazão de nebulização	0,9 L min <sup>-1</sup>
Nebulizador / Câmara de Nebulização	MicroMist / Scott (duplo passo)
Replicatas por amostra	3
Interface	Cones de níquel
Cone de amostragem	1 mm
Cone extrator	0,9 mm
Curvas de calibração (em HNO <sub>3</sub> 4%)	As: 2-20 µg.L <sup>-1</sup> , Cd: 2-20 µg.L <sup>-1</sup> , Co: 2-20 µg.L <sup>-1</sup> , Cu: 2-200 µg.L <sup>-1</sup> , Fe: 2-200 µg.L <sup>-1</sup> , Pb: 2-20 µg.L <sup>-1</sup> , Se: 2-20 µg.L <sup>-1</sup> , Zn: 2-200 µg.L <sup>-1</sup>

O uso de padrões em ICP-MS pode auxiliar, em maior extensão, na correção de flutuações nas intensidades de contagens dos analitos que ocorrem durante o período de análise e, em menor extensão, para compensar possíveis interferências não espectrais em matrizes complexas, como problemas no transporte e ionização dos íons, a utilização de padrões internos é recomendada em ICP-MS<sup>31</sup>. A escolha do padrão interno nem sempre é fácil, pois deverá estar presente em baixas concentrações ou mesmo não estar presente na amostra. Além disso, não deve sofrer e nem causar interferências<sup>84</sup>.

O padrão interno mais efetivo é aquele que possui razão massa/carga e potencial de ionização semelhante ao analito de interesse, e em uma análise multielementar, vários padrões internos devem ser utilizados para cobrir uma larga faixa de massa<sup>85,86</sup>.

Neste trabalho utilizou-se <sup>89</sup>Y e <sup>115</sup>In como padrão interno para os elementos em estudo. A concentração final dos padrões internos foi de 10 ng.L<sup>-1</sup>.

#### 4.2. Reagentes e soluções

Toda a vidraria e frascos de polipropileno utilizados para preparo e armazenamento das soluções analíticas de referência e amostras foram preenchidos com solução de ácido nítrico 10% (v v<sup>-1</sup>) durante 24 horas, enxaguados três vezes com água deionizada e levados para secar em uma capela de fluxo laminar.

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada de alta pureza (18 MΩ cm<sup>-1</sup>)

obtida pelo sistema de ultrapurificação de água Milli-Q (Millipore RiOs-DITM, Bedford, MA, EUA). Ácido nítrico (Merck, Darmstadt, Alemanha) purificado por destilação abaixo do ponto de ebulição com subdestilador de quartzo (DST-1000, Savillex, USA) foi utilizado na decomposição ácida das amostras em micro-ondas.

A avaliação da exatidão dos métodos foi feita por meio do uso de material de referência certificado (MRC) fornecido pelo *National Institute of Standard and Technology* (NIST, *Whole Egg 8415*) e dois outros Materiais de Referência de controle interno do grupo de pesquisa (Atum e Soja).

#### *4.3. Procedimento de preparação das amostras*

Para o estudo foi selecionado o candidato a MR de tecido animal, fígado de ovelha, que está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto – USP sob o protocolo nº 09.1.873.53.5.

##### *Criação dos animais e experimentação*

Ambientação e ganho de peso durante 10 meses. Tratamento a base de ração, feno e água. Peso inicial de 25 kg e peso final de 60 kg, aproximadamente.

Administração dos metais foi realizada via oral, em duas doses de uma mistura contendo acetato de chumbo, arsenato de cálcio, cloreto de mercúrio e nitrato de cádmio a uma concentração de 0,1 mg do metal por kg de peso corporal do animal.

##### *Obtenção dos candidatos a MRC*

Foi realizado a eutanásia dos animais com sobredose de anestésico, com auxílio de um veterinário do Biotério Central da Universidade de São Paulo, campus de Ribeirão Preto. Após o procedimento, os animais foram dissecados separando os rins, fígado, sangue, plasma, músculos, coração e ossos, armazenando-os até a pré-homogeneização, onde foram triturados os tecidos de igual espécie de todos os animais e realizado a liofilização.

Depois dos tecidos serem liofilizados, foi feita a moagem em separado de cada tecido e na sequência a tamisação, resultando num lote de tamanho de 250 µm.

Em seguida para cada tamanho de partícula separado pela tamisação, foi realizada a homogeneização em um homogeneizador em Y e envase.

Os candidatos a MR devidamente envasados foram enviados para esterilização por raios gama no IPEN (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares).

##### *Preparação das amostras para análise em ICP-MS*

Primeiramente foram escolhidas, aleatoriamente, 2 dentre 10 frascos do candidato a MR e agitados por 20 segundos no intuito da homogeneização das partículas.

Em seguida foram identificados numericamente 45 tubos falcon. A pesagem foi realizada em cada um dos tubos utilizando uma balança analítica.

Os materiais de referência de soja e atum foram pesados uma alíquota em triplicata de 200 mg, do MRC *Whole Egg Powder (Reference Material 8415)* foi pesado alíquotas em triplicata de 100 mg.

Os dois frascos escolhidos foram pesados, em triplicata, alíquotas de 50, 100, 200 e 400 mg.

Na sequência foi feita a abertura das amostras com 2 ml de HNO<sub>3</sub>. No branco foi adicionado somente o HNO<sub>3</sub>.

Os tubos foram deixados com a tampa semiaberta para uma pré digestão durante 24 h. Após isso, foram adicionados 1 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30% de alta pureza) e 7 ml de água ultrapura. Em seguida foi realizada a digestão completa por microndas seguindo o programa: aquecimento por 10 min a 100 °C, rampa durante 5 min até 200 °C e por 20 min a 180 °C.

Em seguida o digerido foi retirado e avolumado com água ultrapura até 50 ml e analisado por ICP-MS. A limpeza dos recipientes do micro-ondas foi feita com 4 ml de água ultrapura e 4 ml de ácido nítrico destilado seguindo o mesmo programa de aquecimento acima.

#### 4.4. Estudo da homogeneidade

Para o estudo, 2 frascos de um lote de 10 frascos do material candidato foram aleatoriamente selecionados. A homogeneidade entre os frascos (*between bottle*) para a concentração de As, Cd, Co, Cu, Fe, Pb, Se e Zn, foi avaliada por meio da análise, em triplicata, de amostras de 100 mg dos 2 frascos do material.

A homogeneidade no frasco (*in bottle*) foi feita pela análise de 6 replicatas de um único frasco utilizando massas de 100 mg.

Para as análises de representatividade de massas de amostras empregadas nesse estudo foram avaliadas as massas de 50, 100, 200 e 400 mg.

#### 4.5. Estudo estatístico

Quando se dispõe de uma amostra pequena e a variável numérica não apresenta uma variação normal, ou ainda, quando não há homogeneidade das variâncias, o teste t não é apropriado. Nessa situação, pode-se utilizar o teste não paramétrico de Mann-Whitney. O teste de Mann-Whitney é indicado para comparação de dois grupos não pareados para se verificar se pertencem ou não à mesma população e cujos requisitos para aplicação do teste t de Student não

foram cumpridos. Ao contrário do teste t, que testa a igualdade das médias, o teste de Mann-Whitney (U) testa a igualdade das medianas. Os valores de U calculados pelo teste avaliam o grau de entrelaçamento dos dados dos dois grupos após a ordenação. A maior separação dos dados em conjunto indica que as amostras são distintas, rejeitando-se a hipótese de igualdade das medianas<sup>87,88</sup>.

Na análise estatística deste estudo, foi utilizado o programa SigmaStat 3.5 utilizando o teste não paramétricos Mann-Whitney com nível de significância  $P > 0,05$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. Resultados analíticos dos MR e MRC

Os resultados da avaliação da exatidão dos métodos com o uso de material de referência certificado (MRC) fornecido pelo *National Institute of Standard and Technology* (NIST, Whole Egg 8415) e dois outros Materiais de Referência de controle interno do grupo de pesquisa (Atum e Soja) estão dispostos nas tabelas 3, 4 e 5.

Tabela 3: Concentrações de referência dos elementos constituintes no MR Soja x concentração obtida durante o estudo.

	As	Cd	Co	Cu	Fe	Pb	Se	Zn
Valores de referência								
Média (ng.g <sup>-1</sup> )	15,8	5,1	330,8	10028,0	139262,0	67,1	273,8	30457,0
Desvio	3,8	1,0	18,6	1392,0	34040,0	14,2	102,5	2486,0
%*	24,1	19,6	5,6	13,9	24,4	21,2	37,4	8,2
Valores de obtidos								
Média (ng.g <sup>-1</sup> )	14,7	11,8	443,4	12169,6	146669,5	220,6	339,8	34768,8
Desvio	3,9	0,8	36,8	1046,1	15493,5	66,3	34,5	5694,2
%*	26,4	6,8	8,3	8,6	10,6	30,0	10,2	16,4

(\*) Limite de aceitabilidade (Feinberg et al).

Tabela 4: Concentrações de referência dos elementos constituintes no MR Atum x concentração obtida durante o estudo.

	As	Cd	Co	Cu	Fe	Pb	Se	Zn
Valores de referência								
Média (ng.g <sup>-1</sup> )	5151,0	30,5	14,1	1741,0	42629,0	21,3	6571,0	11914,0
Desvio	594,0	5,5	4,2	379,0	9295,0	30,2	586,0	1585,0
%*	11,5	18,0	29,8	21,8	21,8	141,8	8,9	13,3
Valores de obtidos								
Média (ng.g <sup>-1</sup> )	6071,5	40,2	15,5	1868,7	43755,6	56,2	7344,0	13692,4
Desvio	278,8	1,4	0,2	90,9	2444,4	22,3	334,9	1371,3
%*	4,6	3,4	1,3	4,9	5,6	39,6	4,6	10,0

(\*) Limite de aceitabilidade (Feinberg et al).

Tabela 5: Concentrações de referência dos elementos constituintes no MRC Egg x concentração obtida durante o estudo.

	As	Cd	Co	Cu	Fe	Pb	Se	Zn
Valores de referência								
Média (ng.g <sup>-1</sup> )	10(i)	5(i)	12,0	2700,0	112000,0	61,0	1390,0	67500,0
Desvio			5,0	350,0	16000,0	12,0	170,0	7600,0
%*			41,7	13,0	14,3	19,7	12,2	11,3
Valores de obtidos								
Média (ng.g <sup>-1</sup> )	43,1	1,7	25,5	3554,3	152271,1	127,3	2243,1	73523,6
Desvio	0,4	0,4	2,2	389,6	20714,5	8,1	222,3	7903,9
%*	0,9	23,4	8,5	11,0	13,6	6,4	9,9	10,8

(\*) Limite de aceitabilidade (Feinberg et al).

(\*\*) Estes valores analíticos são estimativas dadas apenas para informação, uma vez que se baseiam em resultados de um número limitado de determinações ou de apenas um método; não são fornecidas quaisquer incertezas.

Com base nos resultados obtidos o método demonstra exatidão para a maioria dos elementos dos Materiais de Referência.

### 5.2. Estudo de Homogeneidade

Para a avaliação da homogeneidade de um candidato a MR, existem dois testes considerados importantes: a avaliação entre frascos (*between bottle*) e a avaliação no frasco (*in bottle*). O estudo de homogeneidade entre frascos tem como objetivo garantir a ausência de variações nas propriedades do candidato a MR no lote de frascos do material selecionados aleatoriamente<sup>63</sup>. No estudo de homogeneidade no frasco, as variações da composição do candidato a MR devem ser avaliadas em um único frasco, com o objetivo de garantir a homogeneidade do material para uma determinada massa empregada no estudo<sup>64</sup>.

Nessa avaliação, esses elementos não demonstraram diferença de homogeneidade entre os frascos, pois o  $P > 0,05$ , conforme resultados na tabela 6.

Tabela 6: Avaliação da homogeneidade entre frascos (*between bottle*) do candidato a MR.

Elemento	P
As	0,100
Cd	0,335
Co	0,696
Cu	0,170
Fe	0,459
Pb	0,771
Se	0,332
Zn	0,294

No estudo da homogeneidade no frasco, um único frasco foi selecionado e analisado em 6

replicatas. Os resultados obtidos para a homogeneidade no frasco para a concentração de As, Cd, Co, Cu, Fe, Pb, Se e Zn, estão apresentados na Figura 1.

Com apenas um desvio padrão, os valores são bem restritivos, ou seja, 68,26% de probabilidade de os resultados estarem concordantes entre si. Porém, com dois desvios padrões, a probabilidade aumenta para 95,44%. Neste caso selecionamos o valor menos restritivo, sendo assim, consideramos dois desvios padrões. Logo, os poucos valores que violaram o valor restritivo de um desvio padrão, não violaram os valores menos restritivos.

Resultados apresentados na Figura 1 indicam homogeneidade adequada do material candidato a MR, visto que as concentrações de As, Cd, Co, Cu, Fe, Pb, Se e Zn no frasco são estatisticamente equivalentes em um limite de confiança de 95,44%.

A média para o Arsênio foi de  $592 \text{ ng.g}^{-1}$  com desvio padrão de  $35,6 \text{ ng.g}^{-1}$ , isso significa uma variação relativa de em torno da média de cerca de 6%, assim como Cobalto e Ferro ( $451 \pm 27,1 \text{ ng.g}^{-1}$  e  $362 \pm 21,7 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$ , respectivamente). Para Cádmiio  $1,75 \pm 0,094 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$ , ou seja, 5,3 de variação em torno da média. Já os elementos Selênio e Zinco a variação em torno da média foi de 5,6% ( $2,45 \pm 0,014 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$  e  $119 \pm 6,7 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$ , respectivamente). O Cobre foi o elemento que apresentou menor desvio percentual em torno da média, 3,6% com valores de  $390 \pm 14 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$ . Finalmente o Chumbo apresentou a maior variação em torno da média, 7,8% com valores de  $1,94 \pm 0,15 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$ . A variação das medidas esteve abaixo de 8%, um valor aceitável para amostras biológicas, que de acordo com Feinberg et al (2004)<sup>89</sup> é de 15%.

Comparando o desvio percentual em torno da média, ou limite de aceitabilidade segundo Feinberg et al, do MR candidato com o MRC (*Whole Egg 8415*) nota-se que os valores em estudo estão bem abaixo do material certificado, conforme dado na tabela 7.

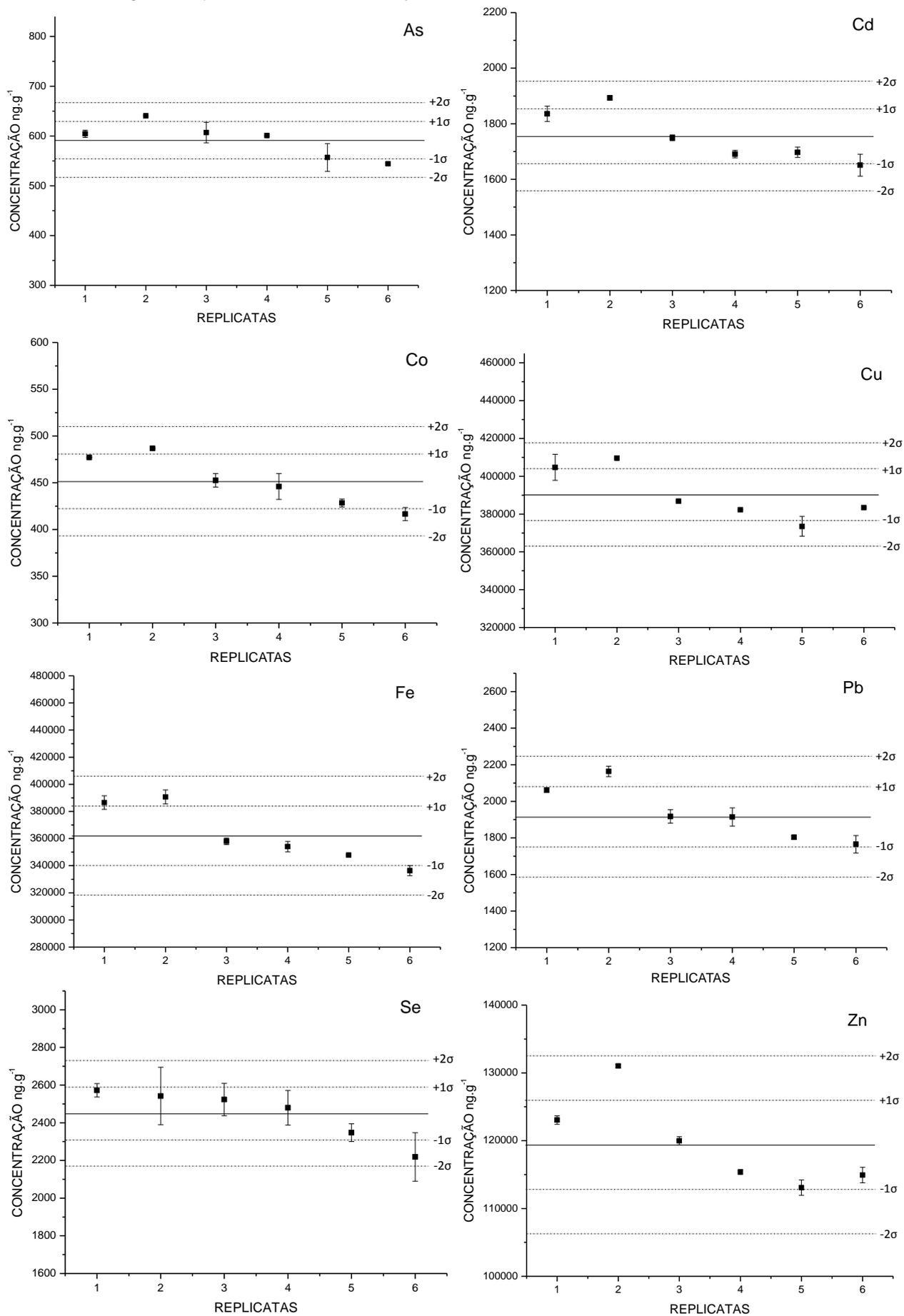
Tabela 7: Concentrações de referência dos elementos constituintes no MRC *Whole Egg 8415*.

	As	Cd	Co	Cu	Fe	Pb	Se	Zn
Média ( $\text{ng.g}^{-1}$ )	10(i)**	5(i)**	12,0	2700,0	112000,0	61,0	1390,0	67500,0
Desvio			5,0	350,0	16000,0	12,0	170,0	7600,0
%*			41,7	13,0	14,3	19,7	12,2	11,3

(\*) Limite de aceitabilidade (Feinberg et al).

(\*\*) Estes valores analíticos são estimativas dadas apenas para informação, uma vez que se baseiam em resultados de um número limitado de determinações ou de apenas um método; não são fornecidas quaisquer incertezas.

Figura 1: Avaliação da homogeneidade no frasco (*in bottle*) do candidato a MR. (—) Valor médio da concentração; (---) Intervalo de confiança 1 $\sigma$  de 68,26% e 2 $\sigma$  de 95,44%.



### 5.3. Massa mínima para análise

Em complemento à avaliação de homogeneidade dentro do frasco, outro teste importante foi realizado. Esse teste visa estabelecer a menor alíquota do material que é capaz de representar toda composição a ser certificada, ou seja, a menor porção do material que deve ser analisada para que os valores de referência e incertezas permaneçam válidos. Dada à sua importância, a massa mínima deve ser informada no certificado<sup>65</sup>.

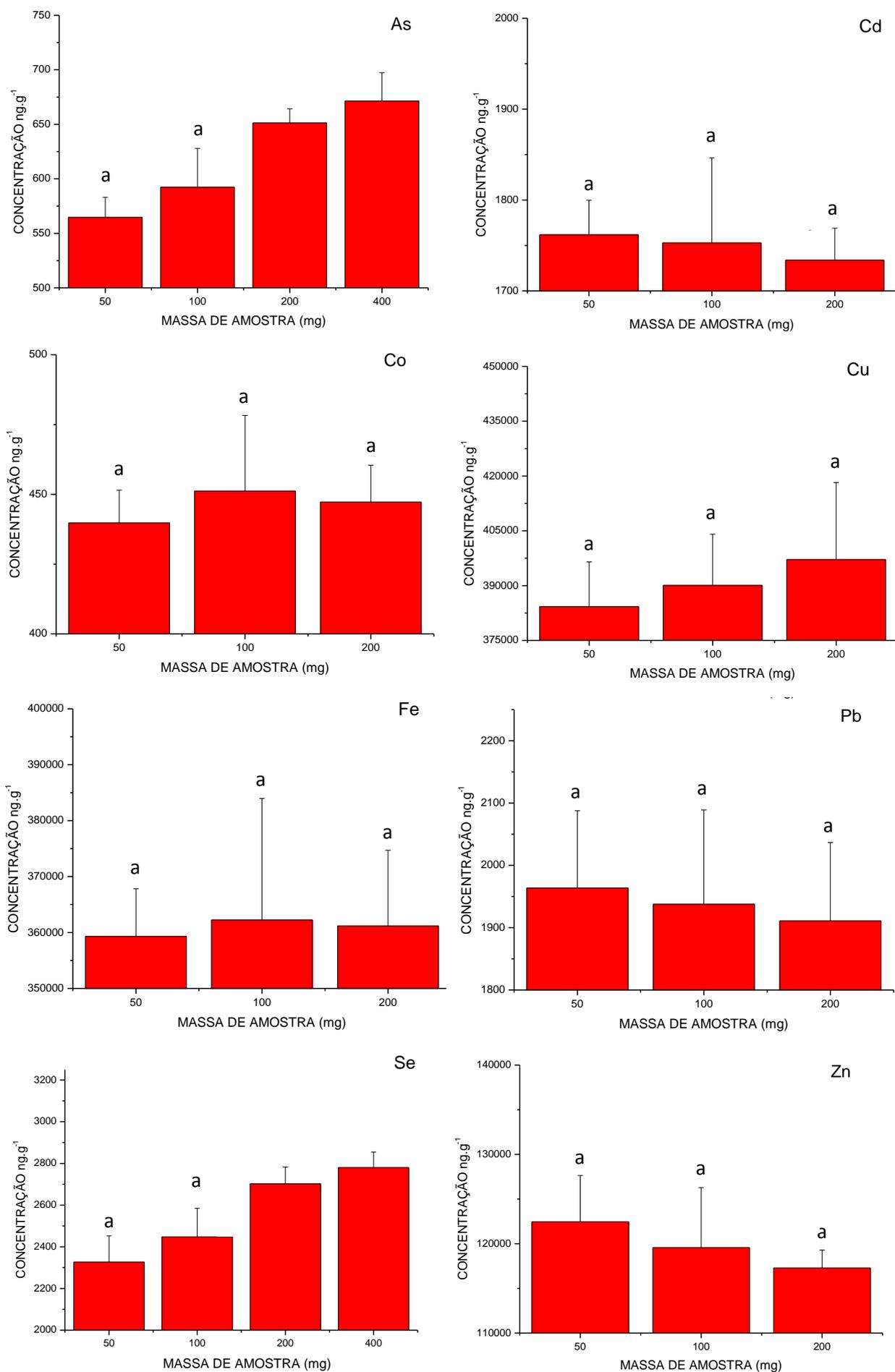
Para todos os elementos, exceto Arsênio e Selênio, não existe diferença estatística entre as massas utilizadas para análise (50 e 100 mg), ou seja,  $P > 0,05$ . Então podemos concluir que a amostra é representativa com a menor massa analisada, e como já descrito, por ser honeroso a produção dos MR, recomenda-se que sejam utilizados adequadamente, isto é, de forma eficiente e econômica. Porém, para Cd, Co e Zn o desvio padrão das análises são menores utilizando 200 mg de massa amostral.

Para Arsênio e Selênio, ocorreram interferências espectrais, nesse caso, a interferência foi poliatômica. Para confirmar a interferência, foi analisada para ambos os elementos mais uma amostra, essa com massa de 400 mg, onde foi verificado o aumento do sinal analítico.

A interferência poliatômica do Arsênio ( $^{75}\text{As}$ ) é o  $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$  e do Selênio ( $^{82}\text{Se}$ ) é o  $^{40}\text{Ar}_2^1\text{H}_2^+$ . Outro fato que prejudica o sinal para Selênio ( $^{82}\text{Se}$ ), pode ser a abundância na natureza do isótopo selecionado: cerca de 9%. Considerando que apenas 3% da amostra aspirada chega ao plasma, o sinal é sempre baixo, próximo a uma região onde há em geral um sinal de fundo considerável<sup>68</sup>.

Para minimizar ou mesmo eliminar as interferências na espectrometria de massas com plasma acoplado, será necessário o uso da célula de reação dinâmica (DRC), conforme método desenvolvido por Batista, B. L. (2009)<sup>69</sup>. O DRC é um dispositivo muito atrativo, pois a amostra é introduzida convencionalmente com a técnica ICP-MS em condições analíticas normais, podendo-se eliminar a etapa de pré-tratamento das amostras para determinados analitos, diminuindo o tempo de análise e o gasto com reagentes. O DRC-ICP-MS é um equipamento versátil para a eliminação de interferentes, dado a oportunidade de escolha de vários gases de reação como Xe, CH<sub>4</sub>, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, He, e mistura H<sub>2</sub>:Ar (1:9 v/v), injetados no interior do DRC. Ele está localizado na câmara de vácuo entre o cilindro de lentes iônicas e o quadrupolo analisador. Os tipos de reações que ocorrem no interior da câmara geralmente são: Reação de transferência de carga; Reação de transferência de próton; Reação de oxidação onde o gás, ao invés de reagir com o interferente, reage com o íon analito<sup>90</sup>.

Figura 2: Avaliação da Massa Mínima para análise do candidato a MR.



## 6. CONCLUSÃO

A avaliação da homogeneidade seguiu procedimentos metrologicamente válidos para a certificação de um material de referência. Além disto, foi possível demonstrar que o candidato a MR é suficientemente homogêneo para Cd, Co, Cu, Fe, Pb e Zn.

Apesar do candidato a MR ser homogêneo para porções de 100 mg, durante a sua caracterização, a massa mínima para análise foi de 50 mg, sendo esta a indicada para reproduzir os valores de referência. Esses valores de massa mínima são significativamente menores que os recomendados para a maioria dos MR disponíveis, indicando que o candidato a MR é adequado para o uso em técnicas analíticas que empregam alíquotas nesta ordem.

Portanto, o candidato a MR está apto a ser enviado para ensaio de estabilidade e depois ser certificado, tornando-se finalmente um MRC, e assim podendo ser utilizado no controle e garantia de qualidade de resultados e em calibrações para amostras de matriz biológica.

Para Arsênio e Selênio serão necessárias novas análises seguindo método utilizado no trabalho “Avaliação do uso da cela de reação dinâmica em espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (DRC-ICP-MS) para determinação de elementos químicos em sangue”<sup>69</sup>, onde foi utilizado gás de reação para diminuir as interferências causadas no sinal analítico.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ABNT, ISO. GUIA 33: 2002. Utilização de materiais de referência certificados.
- [2] JCGM 200:2012, *International vocabulary of metrology Basic and general concepts and associated terms (VIM)*, 3rd editio. 2012.
- [3] RICHTER, Wolfgang. Comparability and recognition of chemical measurement results—an international goal. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, v. 365, n. 7, p. 569-573, 1999.
- [4] RICHTER, W.; DUBE, G. Measurement standards and the general problem of reference points in chemical analysis. *Metrologia*, v. 34, n. 1, p. 13, 1997.
- [5] EURACHEM, CITAC; GUIDE, CITAC. Traceability in Chemical Measurement. 2003.
- [6] DYBCZYŃSKI, R. Preparation and use of reference materials for quality assurance in inorganic trace analysis. *Food Additives & Contaminants*, v. 19, n. 10, p. 928-938, 2002.
- [7] ABNT, ISO. Guia 30: 2000. Termos e definições relacionados com materiais de referência. Rio de Janeiro, RJ: Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), 2000.
- [8] CHUI, Queenie Siu Hang; BISPO, JMA; IAMASHITA, C. O. Estudo de homogeneidade de lote de material silício metálico candidato a material de referência. *Quim Nova*, v. 28, n. 3, p. 497-501, 2005.

- [9] VENELINOV, Tony; QUEVAUVILLER, Philippe. Are certified reference materials really expensive?. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 22, n. 1, p. 15-18, 2003.
- [10] PAUWELS, J. et al. The preparation of codfish candidate reference material to be certified for Pb, Cd, Hg, Fe, and Zn. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, v. 338, n. 4, p. 515-519, 1990.
- [11] QUEVAUVILLER, Philippe. Requirements for production and use of certified reference materials for speciation analysis: a European Commission perspective. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, v. 53, n. 9, p. 1261-1279, 1998.
- [12] EAG – DG RDT. Metrology in chemistry (2000). Disponível em: <<http://ec.europa.eu/research/fp5/pdf/eag-metrologychemistry-en.pdf>>, acessado em março de 2017.
- [13] LEERMAKERS, M. et al. Toxic arsenic compounds in environmental samples: Speciation and validation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 25, n. 1, p. 1-10, 2006..
- [14] MCSHEEHY, Shona et al. The speciation of arsenic in biological tissues and the certification of reference materials for quality control. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 22, n. 4, p. 191-209, 2003.
- [15] STOEPLER, Markus; WOLF, Wayne R.; JENKS, Peter J. (Ed.). *Reference Materials for Chemical Analysis: Certification, Availability and Proper Usage*. John Wiley & Sons, 2008.
- [16] BRIGHT, Harry. Standard Sample Program of National Bureau of Standards. *Analytical Chemistry*, v. 23, n. 11, p. 1544-1547, 1951.
- [17] FLANAGAN, Francis James. Reference samples in geology and geochemistry. *Geostandards Newsletter*, v. 10, n. 2, p. 195-264, 1986.
- [18] Disponível em: <http://www.ipt.br/solucoes/54.htm> acessado em março de 2017.
- [19] Disponível em: [http://www.inmetro.gov.br/noticias/conteudo/revistaABQ\\_Ciencia.asp](http://www.inmetro.gov.br/noticias/conteudo/revistaABQ_Ciencia.asp) acessado em março de 2017.
- [20] Disponível em: <http://www.cetem.gov.br/mrc/> acessado em março de 2017.
- [21] GIOVANELLA, Lígia et al. Políticas e sistema de saúde no Brasil. *SciELO-Editora FIOCRUZ*, 2012. P. 353.
- [22] VALCÁRCEL, Miguel. *The Measurement Process in Chemistry*. In: *Principles of Analytical Chemistry*. Springer Berlin Heidelberg, 2000. p. 101.
- [23] M. A. Z. Arruda, *Trends in sample preparation*. New York: Nova Science Publishers, 2006.
- [24] NOMURA, Cassiana Seimi et al. Análise direta de sólidos por espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite: uma revisão. *Química Nova*, v. 31, n. 1, p. 104-113, 2008.
- [25] ROSSBACH, M.; OSTAPCZUK, P.; EMONS, H. Microhomogeneity of candidate reference materials: comparison of solid sampling Zeeman-AAS with INAA. *Fresenius' journal of analytical*

chemistry, v. 360, n. 3-4, p. 380-383, 1998.

[26] LINSINGER, Thomas PJ et al. Homogeneity and stability of reference materials. *Accreditation and Quality Assurance: Journal for Quality, Comparability and Reliability in Chemical Measurement*, v. 6, n. 1, p. 20, 2001.

[27] VAN DER VEEN, Adriaan MH; LINSINGER, Thomas P.; PAUWELS, Jean. Uncertainty calculations in the certification of reference materials. 2. Homogeneity study. In: *Measurement Uncertainty in Chemical Analysis*. Springer Berlin Heidelberg, 2001. p. 94.

[28] SEGURA, M. et al. Certified reference materials (CRMs) for quality control of trace-element determinations in wastewaters. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 23, n. 3, p. 194-202, 2004.

[29] DIEMER, J. et al. SI-traceable certification of the amount content of cadmium below the ng g<sup>-1</sup> level in blood samples by isotope dilution ICP-MS applied as a primary method of measurement. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, v. 370, n. 5, p. 492-498, 2001.

[30] OLIVAS, R. M.; CÁMARA, C. Sample preparation. Sample treatment for speciation analysis in biological samples. *Handbook of Elemental Speciation: Techniques and Methodology*, R. Cornelis, H. Crews, J. Caruso, and K. Heumann, Eds. John Wiley & Sons, Ltd, 2003, pp. 73-94.

[31] NARDI, Elene P. et al. The use of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) for the determination of toxic and essential elements in different types of food samples. *Food Chemistry*, v. 112, n. 3, p. 727-732, 2009.

[32] DOLAN, Ross et al. Assessment of ICP-MS for routine multielement analysis of soil samples in environmental trace element studies. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, v. 336, n. 2, p. 99-105, 1990.

[33] CROUNSE, ROBERT G. et al. Geochemistry and man: health and disease. 2. Elements possibly essential, those toxic and others. *Applied Environmental Geochemistry*. Academic Press, London, p. 309-333, 1983.

[34] Disponível em: <http://educatinghsc.com/?p=32> acessado em março de 2017.

[35] Disponível em: <https://www.chemistryworld.com/news/confirmation-of-four-new-elements-completes-seventh-row-of-periodic-table-/9312.article> acessado em março de 2017.

[36] REIDLER, N. M. V. L.; GÜNTHER, Wanda Maria Risso. Impactos ambientais e sanitários causados por descarte inadequado de pilhas e baterias usadas. *Revista Limpeza Pública*, v. 60, n. 1, p. 20-26, 2003.

[37] GÜNTHER, Wanda Maria Risso. Contaminação ambiental por disposição inadequada de resíduos industriais contendo metais pesados: estudo de caso. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

[38] SAVORY, J.; WILLS, M. R. Trace metals: essential nutrients or toxins. *Clinical chemistry*, v. 38, n. 8B Pt 2, p. 1565-1573, 1992.

- [39] PATRIARCA, M. et al. Recent developments in trace element analysis in the prevention, diagnosis, and treatment of diseases. *Microchemical journal*, v. 59, n. 2, p. 194-202, 1998.
- [40] BRUNETTO, Márcio Antonio et al. Imunonutrição: o papel da dieta no restabelecimento das defesas naturais. *Acta Scien Veterinariae*, v. 35, n. 2, p. 5230-2, 2007.
- [41] GOYER, Robert A. Nutrition and metal toxicity. *The American journal of clinical nutrition*, v. 61, n. 3, p. 646S-650S, 1995.
- [42] PARSONS, Patrick J.; BARBOSA, Fernando. Atomic spectrometry and trends in clinical laboratory medicine. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, v. 62, n. 9, p. 992-1003, 2007.
- [43] Disponível em: <https://global.britannica.com/biography/Paracelsus> acessado em março de 2017.
- [44] KLAASSEN, Curtis D. et al. (Ed.). *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons*. New York: McGraw-Hill, 1996.
- [45] KANUMAKALA, S.; BONEH, A.; ZACHARIN, M. Pamidronate treatment improves bone mineral density in children with Menkes disease. *Journal of inherited metabolic disease*, v. 25, n. 5, p. 391-398, 2002.
- [46] GREENWOOD, Norman Neill; EARNSHAW, Alan. *Chemistry of the Elements*. 1984. Pergamon Press, Oxford, 1542p
- [47] FRAGA, Cesar G.; OTEIZA, Patricia I. Iron toxicity and antioxidant nutrients. *Toxicology*, v. 180, n. 1, p. 23-32, 2002.
- [48] TSALEV, D. L. *Atomic absorption spectrometry in occupational and environmental health practice*. Volume III, CRC Press, New York, 1984.
- [49] CHAUSMER, Arthur B. Zinc, insulin and diabetes. *Journal of the American College of Nutrition*, v. 17, n. 2, p. 109-115, 1998.
- [50] WHO. *Arsenic. Environmental Health Criteria* Genebra: WHO, 1981.
- [51] SHIBATA, Yasuyuki; MORITA, Masatoshi; FUWA, Keiichiro. Selenium and arsenic in biology: their chemical forms and biological functions. *Advances in biophysics*, v. 28, p. 31-80, 1992.
- [52] BUCHET, J. P.; PAUWELS, J.; LAUWERYS, R. Assessment of exposure to inorganic arsenic following ingestion of marine organisms by volunteers. *Environmental research*, v. 66, n. 1, p. 44-51, 1994.
- [53] HSUEH, Yu-Mei et al. Urinary arsenic speciation in subjects with or without restriction from seafood dietary intake. *Toxicology letters*, v. 133, n. 1, p. 83-91, 2002.
- [54] ON THE EVALUATION, IARC Working Group et al. *ARSENIC AND ARSENIC COMPOUNDS*. 2012. Disponível em:

<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100C/mono100C-6.pdf> acessado em março de 2017.

[55] ACGIH. American Conference of Governmental Industrial Hygienists. Threshold Limits Values (TLVs) for Chemical Substances and Physical Agents Biological Exposure Indices for 2003. Cincinnati, OH, 2003.

[56] FRIBERG, L.; NORBERG, G. F.; VOUK, V. B. Handbook of metal toxicology. 1979.

[57] ATSDR, July. Cadmium-ATSDR Toxicological Profile. Atlanta, GA: Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1999. Disponível em: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp5.pdf> acessado em março de 2017.

[58] UCL. Université Catholique de Louvain, Belgic, Monitoring biologique de l'exposition aux substances chimiques. Disponível em: <http://www.toxi.ucl.ac.be/documents/mbi.htm> acessado em março de 2017.

[59] ON THE EVALUATION, IARC Working Group et al. ARSENIC AND ARSENIC COMPOUNDS. 1993. Disponível em <https://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100C/mono100C-8.pdf> acessado em março de 2017.

[60] HAYES, W. A. Principles and Methods of Toxicology, 4a edição, Taylor & Francis, Philadelphia, 2001, p. 654 a 682.

[61] WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Environmental Health Criteria 3. Lead. Environmental Health Criteria 3. Lead, 1977.

[62] ON THE EVALUATION, IARC Working Group et al. Inorganic And Organic Lead Compounds. 2006. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol87/mono87.pdf> acessado em março de 2017.

[63] MOREIRA, Edson Gonçalves. Preparo e caracterização de um material de referência de mexilhão Perna perna (Linnaeus, 1758). 2010. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

[64] LINSINGER, Thomas PJ et al. Homogeneity and stability of reference materials. Accreditation and Quality Assurance: Journal for Quality, Comparability and Reliability in Chemical Measurement, v. 6, n. 1, p. 20-25, 2001.

[65] COTTA, Aloisio Jose Bueno et al. Estudo da homogeneidade e atribuição de valores e incertezas certificados a um material de referencia de basalto (BRP-1 Basalto de Ribeirão Preto). 2007.

[66] EVANS, E. Hywel; GIGLIO, Jeffrey J. Interferences in inductively coupled plasma mass spectrometry. A review. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, v. 8, n. 1, p. 1-18, 1993.

[67] PRICHARD, Elizabeth; MACKAY, G. M.; POINTS, J. Trace analysis: a structured approach to obtaining reliable results. Royal Society of Chemistry, 1996; p.126-129.

- [68] MAY, Thomas W.; WIEDMEYER, Ray H. A table of polyatomic interferences in ICP-MS. *ATOMIC SPECTROSCOPY-NORWALK CONNECTICUT-*, v. 19, p. 150-155, 1998.
- [69] BATISTA, Bruno Lemos. Avaliação do uso da cela de reação dinâmica em espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (DRC-ICP-MS) para determinação de elementos químicos em sangue. 2009. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- [70] GINÉ-ROSIAS, Maria Fernanda Georgina. Espectrometria de massas com fonte de plasma (ICP-MS). CENA, 1999.
- [71] DUAN, Taicheng et al. Elimination of matrix effect and spectral interference by two compactly combined separations in the determination of Cd in geological samples with high Mo, Zr or Sn contents by ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 22, n. 4, p. 403-406, 2007.
- [72] SALIN, Eric D.; ANTLER, Margaret; BORT, Guillaume. Evaluation of the simultaneous use of standard additions and internal standards calibration techniques for inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 19, n. 11, p. 1498-1500, 2004.
- [73] GARDOLINSKI, Paulo CFC et al. Determination of Cd, Pb, Zn and Cu in sediment compartments by sequential extraction and isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry (ID-ICP-MS). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 13, n. 3, p. 375-381, 2002.
- [74] HU, Zhaochu et al. Suppression of interferences for direct determination of arsenic in geological samples by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 20, n. 11, p. 1263-1269, 2005.
- [75] MCSHANE, William J.; PAPPAS, R. Steven; PASCHAL, Dan. Analysis of total arsenic, total selenium and total chromium in urine by inductively coupled plasma-dynamic reaction cell-mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 22, n. 6, p. 630-635, 2007.
- [76] COLON, Mireia; HIDALGO, Manuela; IGLESIAS, Monica. Correction strategies over spectral interferences for arsenic determination in aqueous samples with complex matrices by quadrupole ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 24, n. 4, p. 518-521, 2009.
- [77] JARVIS, K. E. et al. *handbook of ICP-MS*. Blackie, Glasgow, v. 256, 1992.
- [78] ALLAIN, P. et al. Investigation of the direct determination of uranium in plasma and urine by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytica chimica acta*, v. 251, n. 1-2, p. 183-185, 1991.
- [79] IGLESIAS, Mònica et al. Evaluation of an ICP-collision/reaction cell-MS system for the sensitive determination of spectrally interfered and non-interfered elements using the same gas conditions. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 17, n. 10, p. 1240-1247, 2002.
- [80] D'ILIO, Sonia et al. Dynamic reaction cell ICP-MS for determination of total As, Cr, Se and V in complex matrices: Still a challenge? A review. *Analytica chimica acta*, v. 698, n. 1, p. 6-13,

2011.

[81] TAN, S. H.; HORLICK, Gary. Background spectral features in inductively coupled plasma/mass spectrometry. *Applied Spectroscopy*, v. 40, n. 4, p. 445-460, 1986.

[82] REED, Nicola M. et al. Characterization of polyatomic ion interferences in inductively coupled plasma mass spectrometry using a high resolution mass spectrometer. *Journal of analytical atomic spectrometry*, v. 9, n. 8, p. 881-896, 1994.

[83] MONTASER, Akbar. *Inductively coupled plasma mass spectrometry*. John Wiley & Sons, 1998.

[84] SARTOROS, Christine; SALIN, Eric D. Automatic selection of internal standards in inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, v. 54, n. 11, p. 1557-1571, 1999.

[85] THOMPSON, Joseph J.; HOUK, R. S. A study of internal standardization in inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Applied spectroscopy*, v. 41, n. 5, p. 801-806, 1987.

[86] VANHAECKE, Frank et al. The use of internal standards in ICP-MS. *Talanta*, v. 39, n. 7, p. 737-742, 1992.

[87] NETO, Arthur Alexandre Hackbarth; STEIN, Carlos Efrain. *Uma abordagem dos testes não-paramétricos com utilização do Excel. Uma abordagem dos testes não-paramétricos com utilização do Excel*, 2003.

[88] MCKNIGHT, Patrick E.; NAJAB, Julius. Mann-Whitney U Test. *Corsini Encyclopedia of Psychology*, 2010.

[89] FEINBERG, Max et al. New advances in method validation and measurement uncertainty aimed at improving the quality of chemical data. *Analytical and bioanalytical chemistry*, v. 380, n. 3, p. 502-514, 2004.

[90] TANNER, Scott D.; BARANOV, Vladimir I.; BANDURA, Dmitry R. Reaction cells and collision cells for ICP-MS: a tutorial review. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, v. 57, n. 9, p. 1361-1452, 2002.