

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO BACHARELADO EM QUÍMICA

Avaliação da distribuição de elementos em tecidos animais e homogeneidade intrafrasco em materiais de referência candidatos a certificação

Karen Regina da Silva Santos

Professor Orientador: Bruno Lemos Batista

Santo André

Universidade Federal do ABC

Avaliação da distribuição de elementos em tecidos animais e homogeneidade intrafrasco em materiais de referência candidatos a certificação

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal do ABC como parte dos requisitos necessários para se obter o título de Bacharel em Química.

Aluna: Karen Regina da Silva Santos

Kom Regim de Liber Santos

Orientador: Bruno Lemos Batista

Buro Jemos Pertiste

Santo André

SUMÁRIO

1.Introd	lução	1	
2.Objeti	2.Objetivos		
3.Meto	dologia	5	
3.1.	Homogeneização intrafrascos	5	
3.2.	Digestão úmida em sistema aberto	6	
3.3.	Aplicação da Metodologia de ICP-MS	7	
4.Result	ados e Discussões	8	
4.1. intraf	Tratamento das amostras, avaliação da qualidade das análises e homogeneidade rasco	8	
4.2. (pulm	Avaliação da distribuição de elementos tóxicos e essenciais em tecidos de carneiros não, baço, coração e músculo)	15	
5.Conclusão			
6.Referências Bibliográficas			
Apêndio	ce	. 23	

Resumo

A produção de materiais de referência passou a ser de vital importância, devido a suas mais diversas aplicações em áreas do conhecimento, principalmente a sua utilização no controle de qualidade e usos para a compreensão de diversas atividades no organismo vivo. Esses materiais passam por diversas etapas para que seja certificado a sua utilização. As determinações de elementos traço sejam eles tóxicos (como chumbo ou arsênio) ou essenciais (como zinco ou selênio), se tornaram possíveis devido ao avanço da tecnologia dos equipamentos capazes de detectar as quantidades mesmo que mínimas encontradas em diversas matrizes. No Brasil existe uma carência tanto de produção, quanto de certificação de materiais de referência, e acaba sendo importado para que as pesquisas no país possam progredir. Portanto, este projeto visou avaliar a distribuição de elementos químicos nos diversos tecidos de carneiros coletados e também uma das etapas de certificação (homogeneidade intrafrascos) para determinar as concentrações de analitos de interesse (manganês, cobalto, cobre, zinco, arsênio, selênio, cádmio, chumbo) em diversos tecidos de carneiros. Para tal, amostras em pó de pulmão, baço, coração e músculo foram obtidas através de carneiros intencionalmente contaminados via oral com uma solução contendo chumbo, cádmio, mercúrio e arsênio, foi utilizado a metodologia de digestão via úmida em sistema aberto para a obtenção dos analitos de interesse, para a aplicação da espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). Apresentando para os materiais de referência Atum e Farinha de Soja homogeneidade para os analitos escolhidos, exceto para arsênio, cádmio e selênio, onde os valores fugiram do esperado dificultando uma possível certificação. Na avaliação da distribuição dos elementos entre os tecidos o Cobre apresentou a maior concentração de 385 ± 8,5 mg.kg⁻¹ a 399,9 ± 10,3 mg.kg⁻¹, e a menor concentração também foi de um elemento essencial o Cobalto com valores de 0.27 ± 0.01 mg.kg⁻¹ a 0.28 ± 0.01 mg.kg⁻¹, estes ultimo apresentou os valores mais precisos da análise. Foi obtido ainda, de maneira geral, uma distribuição homogênea dos elementos em todos os tecidos para o nível de confiança adotado de 95%, e o tecido onde ocorreu a maior acumulação de elementos foi o coração, seguido pelo músculo, baço e pulmão obtidos através da análise estatística.

Palavras Chave: materiais de referência, homogeneidade intrafrascos, elementos traço.

1. Introdução

As medidas analíticas têm papel indiscutível sobre diferentes setores, como saúde, meio ambiente, tecnológico e econômico, no entanto a qualidade dessas medidas e a capacidade de obter medições precisas e exatas é fruto de uma sociedade moderna avançada tecnologicamente (JCGM, 2002). Houve um grande aumento de desenvolvimento de métodos analíticos instrumentais mais eficientes, com isso começou a expansão do desenvolvimento de materiais de referência (RM) visando exatidão nos métodos e controle da qualidade (Richter, 1999).

Os materiais de referência surgiram para a necessidade de adequar padrões primários por volta do século 19. Um dos primeiros materiais de referência foi criado em 1880 para a análise de gordura do leite, com a finalidade de identificar produtos alterados (Stoeppler *et al.*, 1999). A produção dos materiais de referência só foi efetivamente iniciada após a fundação da NIST (*National Institute of Standards and Technology*), agência criada com a intenção de atender a crescente demanda de padrões. Em 1951 a NIST já contava com mais de 541 RMs, entre hidrocarbonetos, óleos e ligas metálicas (Bright, 1951; Stoeppler *et al.*, 1999). A produção de matrizes biológicas é mais recente e iniciou-se por volta de 1960 pela mesma agência (Stoeppler *et al.*, 1999).

Os materiais de referência (RM) são definidos por Richter e Dube como materiais ou substâncias nas quais uma ou mais de suas propriedades são homogêneas e estabelecidas de modo que podem ser empregadas nas calibrações e validações de métodos (ISO guide 30, 2015). O material de referência deve passar por etapas de certificação conduzidas por uma agência certificadora como a NIST, que emitirá uma documentação específica (certificação) que irá conter muitas das informações referentes às propriedades do material com a respectiva incerteza e rastreabilidade, obtidos com metodologias adequadas e procedimentos válidos (Figura A, apêndice), o material recebe o nome de material de referência certificado (CRM) (ISO guide 30, 2015).

A produção dos materiais de referência envolve uma serie de cuidados e vários parâmetros que devem ser investigados para assegurar a qualidade do produto final. Deve-se tomar cuidado para evitar

perda de analitos e contaminações para manter a composição química do material durante o processo de produção, pois afetam diretamente a precisão e exatidão dos resultados (Pauwels *et al.*, 1990).

Os parâmetros que devem ser investigados são a representatividade da amostra, homogeneidade, estabilidade da amostra a longo prazo, massa mínima da amostra, tamanho de partículas e segregação de analitos (Quevauviller *et al.*, 1998 ; Stoeppler *et al.*, 1999).

O Brasil ainda é relativamente jovem quando o assunto é produção de materiais de referência, principalmente quando comparado com países como, por exemplo, EUA, Japão, Canadá e China. Um dos motivos para isso é que estes produtos requerem diferentes níveis de propriedades, e matrizes extremamente complexas, por esse motivo apresentam um custo relativamente alto. (Caroli *et al.*, 2000).

Existe a necessidade de serem realizadas medições químicas, uma boa infraestrutura nacional de metrologia (INM), processos rápidos e precisos podem melhorar muito a qualidade de vida da população. Uma INM tem como função dar aos laboratórios condições para realização de um trabalho melhor e mais preciso, além de fornecer materiais de referência de calibração (MRC), uma vez que estes MRCs são obtidos dentro do país isto pode acelerar processos e baixar custos de inúmeras etapas (Taylor *et al.*, 2004), uma vez que atrasos podem causar grande perda de produtividade por parte dos laboratórios (Howarth, 2000).

As MRCs são amplamente utilizadas em química analítica para validação de métodos, isto é, estabelecer precisões de medidas, rastreabilidade e qualidade em futuras análises feitas repetidamente. Um laboratório com uma "acreditação", possui medidas reconhecidas, e padrões utilizados pelo mundo, pode ser considerado como referência para produção de pesquisas e resultados a níveis internacionais (Thompson *et al.*, 2006).

Nem sempre é possível encontrar MRC em estudos sobre química, e isto pode acabar atrasando certas pesquisas, sendo assim os laboratórios acabam produzindo suas próprias amostras de RMs e as analisando contra MRCs. Os processos para produção de uma amostra qualificada são tratados com seriedade, pois outros laboratórios podem vir a utilizar estes dados no futuro, por isso o cuidado com o local de recolhimento das amostras, as mudanças realizadas em cada processo, cortes, temperatura em

que foram encontradas, tamanho das partículas, tudo isso é devidamente analisado e posteriormente computado para então ser lançado aos meios de pesquisa (Carioni *et al.*, 2011). Uma amostra bem tratada gera resultados seguros e confiáveis.

Um método preciso para análises de amostra é pré-requisito quando se fala da produção de um RM. Assim, para reduzir as chances de ocorrerem erros devido à contaminação da amostra e perda de dados, é preferível o uso de métodos simples de tratamento de amostras e análise. Em um estudo realizado anteriormente para a preparação de RM de atum como material de referência, foi observado que durante os processos não houve contaminações nas amostras o que culminou na produção de RMs qualificados para futuras pesquisas (Carioni *et al.*, 2011).

A mudança quanto à produção de amostras e RMs confiáveis em metrologia química sofreu sua maior mudança no período de 1985-1990 quando o pensamento sobre o sistema internacional de medidas sofreu uma grande mudança em sua forma de análise (Sistema Internacional de Medidas, 2016). Após estas mudanças comitês como CCQM, "Comité' Consultatif pour la Quantité' de Matière" (Comité Consultivo para o Material Quantidade), foram criados para auxiliar e garantir que pesquisas e métodos de medição em química (metrologia) sejam incentivados e que seus resultados possam ser utilizados das melhores formas possíveis (De Bièvre, 2011).

Quanto mais se observa o crescimento pela demanda dessas MRCs maior é o incentivo recebido pela comunidade científica. Segundo Paul De Bièvre (2011) descreve em seu Editorial: "Looking back at two decades of 'Metrology in Chemistry", algumas mudanças que ocorreram por parte da comunidade científica em relação ao sistema de medidas em química.

Ao trabalhar com metrologia em química analítica alguns parâmetros devem ser especificados (Heydorn, 2013).

 Mesurando (quantidade a ser mesurada), todas as "quantidades" devem ser medidas, quantidade inicial do objeto a ser estudado, as modificações que ocorreram durante os processos, possíveis erros, possíveis contaminações, estas anotações levaram ao "verdadeiro" valor do mesurando.

- Determinando (entidade a ser determinada), para uma análise mais objetiva e eficaz a
 entidade (os dados a serem obtidos) devem ser determinados antes do início das análises,
 isto evita que sejam analisados dados fora do objetivo inicial do projeto.
- Alvo de amostragem (sistema a ser analisado), sem um sistema adequado para a análise o mesurando pode gerar dados equivocados, e erros devido a um sistema mal aplicado, por sistema entenda que este pode variar desde a uma substância específica a um conjunto universo constituído por tecidos, ar, água, ou qualquer outro fator que venha a ser relevante para a pesquisa.

A produção de dados sustentáveis para âmbito nacional e internacional, faz com que os laboratórios exijam e realizem pesquisas com um critério cada vez maior. Países ao redor mundo vêm investindo cada vez mais na capacidade e acreditação de seus laboratórios. Países das Américas e pertencentes à União Europeia e candidatos a EU, vêm ampliando seus esforços para a criação de entidades capazes de certificar e acreditar estas pesquisas (Drnovsek, 2008; Quevauviller, 1998).

Mas o que faz com que estes países invistam tanto nessas novas áreas? A resposta é simples: a demanda do mercado interno e da população por métodos que garantem a qualidade dos produtos que podem vir a ser processados, vendidos e consumidos pela população. Por exemplo, tanto pesquisas por plantas com baixa absorção de substâncias tóxicas quanto o controle de qualidade de uma empresa que produz alimentos de origem animal necessitam dos MRCs para controle e, finalmente, controlar o risco de contaminação pela população (Kaarls, 2007). As necessidades atuais da população fazem com que seja necessário determinarem as quantidades não só de elementos químicos mas de cada espécie deste elemento. Essa demanda é maior quando se fala de elementos tóxicos à biologia humana, ou seja, há uma ampla preocupação do governo quanto a saúde da população (Quevauviller, 1998).

2. Objetivos

O objetivo deste trabalho foi a avaliação da distribuição de elementos tóxicos e essenciais em tecidos de carneiros (pulmão, baço, coração e músculo) e a caracterização de homogeneidade intrafrascos em materiais candidatos a certificação.

3. Metodologia

3.1. Homogeneização intrafrascos

O método empregado foi a análise da homogeneização intrafrascos (*in bottle*), no qual as variações da composição da amostra após envasamento devem ser avaliadas em um único frasco, para garantir a homogeneidade do material para uma determinada massa empregada (Quevauviller, 1998).

O projeto de utilização dos animais (carneiros) para estudo foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais da Universidade de São Paulo, campus Ribeirão Preto, com processo número 09.1.873.53.5. Os tecidos foram obtidos de cerca de 8 animais, que receberam, cada um por via oral, uma mistura contendo acetato de chumbo, arsenato de cálcio, cloreto de mercúrio e nitrato de cádmio a uma concentração de 1 mg kg⁻¹ de cada metal, por semana, durante 2 semanas.

Os animais foram criados em um piquete com pasto e abrigo destinado somente a eles, onde receberam feno, água, ração todos os dias dias e cuidados de um veterinário. Para ambientação, os animais adultos foram vermifugados (ivomectina 0,8%, com dose oral de 2,5 mL/10 kg) criados e tratados normalmente por 60 dias, sem administração de qualquer toxicante.

Para a obtenção do material utilizado no presente estudo, os animais (carneiros) foram contaminados em duas etapas:

- Primeira administração: administrada uma solução, via oral, com ajuda de um veterinário especializado, a uma concentração de 1 mg.kg⁻¹ de cada metal (chumbo, cádmio, mercúrio e arsênio) por animal.
- Segunda administração: sete dias após a primeira administração, foi administrada uma solução, via oral, com ajuda de um veterinário especializado, a uma concentração de 1 mg.kg⁻¹ de cada metal (chumbo, cádmio, mercúrio e arsênio), por animal.

Após a contaminação os mesmos foram sacrificados, para o tecido ser obtido depois de retirado cirurgicamente, onde o mesmo foi triturado, homogeneizado, liofilizado, pulverizado, tamizado em peneira com malha < 200 μm, homogeneizado novamente com homogeneizador em Y (Marconi para 3,5 kg),

envasado e irradiado com raios gama, no Ipen (Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares, São Paulo, Brasil).

Para o presente estudo serão utilizados os RM de atum e farinha de soja como referência para possíveis erros durante preparo e para controlar os resultados como controle de qualidade, não foi utilizado material de referencia certificado pelo alto custo e difícil importação. O atum teve sua origem na USP (Universidade de São Paulo, campus SP), e a farinha de soja no CENA (Centro de Energia Nuclear na Agricultura, USP, Piracicaba, São Paulo), foram produzidos em projetos para certificação, mas não foram certificados. Porém temos dados de referência, pois em outra oportunidade o grupo de pesquisa os analisou contra um MRC.

No estudo de homogeneidade intrafrascos foi selecionado e analisado 1 frasco em sextuplicata. Inicialmente o frasco contendo o material sólido dos RM e dos tecidos a ser analisados foram retirados do repouso e o pó foi disperso por agitação para efetuar a homogeneização da amostra. A massa empregada para a análise foi de 200 mg para os RM atum e farinha de soja e para as amostras de interesse de tecidos de carneiros: pulmão, baço, coração e músculo (das coxas das pernas traseiras).

Foi adotado a convenção do nível de confiança de 95% para aprovar a homogeneidade do elemento, visto que o nível de confiança é representado pela média mais ou menos um desvio padrão para nível de confiança de 68%, e a média mais ou menos dois desvios padrão para o nível de confiança de 95%. Apresentados nas figuras 2, 3, 4 e 5.

3.2. Digestão úmida em sistema aberto

Foi efetuada a abertura da amostra com a adição de 1 ml de acido nítrico subdestilado (DST-1000, Savillex, EUA), no tubo falcon, adaptado do método para forno de microondas, proposto por Nardi (Nardi, 2009). As tampas foram deixadas semi-abertas, na capela para liberação dos gases e as amostras ficaram 48hs em pré digestão. Após foram levadas a digestão em sistema aberto em bloco digestor (EasyDigest, Analab, França) com temperatura controlada de 80° - 90°C por aproximadamente 3 hs. Após essa etapa foi feita a re-suspensão por diluição de 13 ml com água ultra pura (RiOs-D Milli-Q,

Millipore, EUA) as amostras foram conduzidas para análise por espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).

3.3. Aplicação da Metodologia de ICP-MS

Na etapa de desenvolvimento do método ICP-MS, saindo da etapa de digestão, as amostras foram submetidas a análises por ICP-MS equipado com célula de reação operando com Hélio de alta pureza (Tabela 1). O sistema de introdução da amostra foi composta de uma câmara de nebulização de duplopasso e um nebulizador tipo Meinhard ligados por tubos do tipo Tygon a bomba peristáltica do ICP-MS (fixada em 20 rpm). Outras configurações instrumentais, condições de operação são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros instrumentais utilizados para o ICP-MS e limite de detecção.

Instrumento	ICP-MS Agilent 7700
Nebulizador	Meinhard
Câmara de nebulização	Scott (duplo caminho)
Bico injetor / tocha	Quartzo para amostras clínicas (2.0 mm)
Potência de Rádio Frequência	1550 W
Vazão do gás de plasma	15 L min ⁻¹
Vazão do gás nebulizador	1 L min ⁻¹
Interface	Cones de Níquel
Cone de amostragem	1 mm
Cone extrator (Skimmer)	0,9 mm
Isótopos monitorados (limite de detecção em μg L ⁻¹)	55 Mn (0.058) 59 Co (0.002) 63 Cu (0.021) 66 Zn (0.322) 75 As (0.017) 78 Se (0.026) 111 Cd (0.006) 207 Pb(0.003)
Padrão interno	¹⁰³ Rh
Tempo de integração (s)	3
Replicatas	3
Sweeps	20
Aplicação da cela de colisão (He > 99,999%)	Mn, Co, Cu, Zn, As, Se e Cd

As amostras e os brancos foram analisados por ICP-MS para a determinação das concentrações totais dos analitos de interesse escolhidos. Os resultados foram emitidos e processados pelo software do equipamento (Mass Hunter, Agilent, Japão). Na Figura 1 temos todos os passos até a análise.

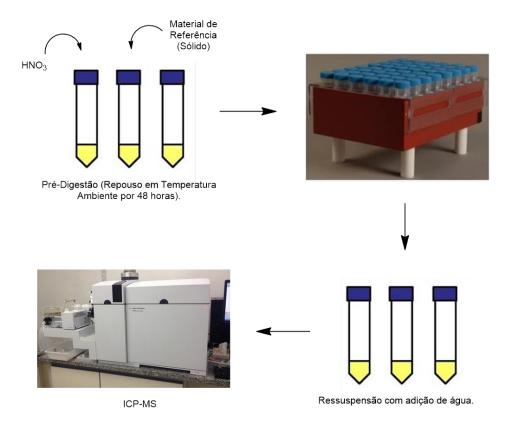


Figura 1: Fluxograma da análise dos Materiais de Referência (RM). ICP-MS: espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado.

4. Resultados e Discussões

4.1. Tratamento das amostras, avaliação da qualidade das análises e homogeneidade intrafrasco

O método da digestão via úmida é bem aceito para dissolução de materiais orgânicos, consistindo na destruição da matéria orgânica através da digestão ácida, em alta temperatura. O ácido oxida a matéria orgânica a dióxido de carbono, água e outros compostos voláteis, que são eliminados, deixando apenas os sais ou ácidos dos constituintes inorgânicos (Christian, 1994)

Material
$$_{org}$$
 + HNO₃ \longrightarrow CO₂ + H₂O + NO_x

Dos vários constituintes inorgânicos providos pela digestão, foram escolhidos alguns elementos tóxicos e essenciais para fossem determinados pelo ICP-MS. Foram escolhidos como elementos tóxicos: Arsênio, Cadmio e Chumbo e os elementos essenciais Manganês, Cobalto, Cobre, Zinco e Selênio.

No estudo da homogeneidade intrafrascos, visando garantir a homogeneidade do material para uma determinada massa, as variações da composição da amostra após o envasamento devem ser avaliadas em um único frasco (Carioni, 2014) O frasco foi analisado em sextuplicata para o baço, coração e musculo, já o pulmão foi analisado somente em triplicada devido a baixa quantidade de material para análise. Os valores de concentração encontrados bem como seus desvios estão expressos na Tabela 2 para o material de referência de atum, e na Tabela 3 para a farinha de soja. Como observado na Tabela 2 a avaliação dos resultados estão de acordo com o esperado para os RM de atum e farinha de soja para os elementos: Mn, Co, Cu, Zn, e Pb.

Tabela 2. Valores de concentração dos analitos em material de referência de atum para avaliação do controle de qualidade das análises. LD: limite de detecção. (média ± desvio padrão)

Elemento	Valor encontrado Atum (mg.kg ⁻¹)	Valor de referência Atum (mg.kg ⁻¹)
Mn	$0,199 \pm 0,004$	$0,295 \pm 0,154$
Co	$0,008 \pm 0,001$	$0,014 \pm 0,005$
Cu	1,54 ± 0,04	1,68 ± 0,21
Zn	$11,3 \pm 0,5$	$12,1 \pm 1,3$
As	$6,49 \pm 0,30$	$5,15 \pm 0,60$
Se	$8,12 \pm 0,41$	$6,57 \pm 0,65$
Cd	0.037 ± 0.002	$0,028 \pm 0,005$
Pb	<ld< td=""><td><ld< td=""></ld<></td></ld<>	<ld< td=""></ld<>

Tabela 3. Valores de concentração dos analitos em material de referência de Farinha de Soja para avaliação do controle de qualidade das análises. LD: limite de detecção. (média ± desvio padrão)

Elemento	Valor encontrado Farinha de Soja (mg.kg ⁻¹)	Valor de referência Farinha de Soja (mg.kg ⁻¹)
Mn	33,785 ± 1,455	32,106 ± 1,867
Co	0.330 ± 0.015	0.330 ± 0.020
Cu	11,240 ± 0,445	10,648 ± 0,349
Zn	33,546 ± 1,367	32,041 ± 1,537
As	0,017 ± 0,002	0.017 ± 0.003
Se	$0,059 \pm 0,018$	$0,263 \pm 0,091$
Cd	0,007 ± 0,001	$0,005 \pm 0,001$
Pb	0.076 ± 0.003	$0,068 \pm 0,005$

Para As, Cd e Se no RM atum os resultados obtidos foram 26,0, 32,1 e 23,6% maiores que a média, respectivamente (Tabela 2). O elemento Se no RM de farinha de soja apresentou valor médio 77,6% menor que o valor de referência (0,263 mg.kg⁻¹). Entre as explicações para as divergências entre concentrações encontradas e as de referências estão a homogeneidade do pó, interferências durante as análises, distribuição do analítos em diferentes tamanhos de partícula e contaminações. Porém observa-

se também que o desvio padrão para o presente ensaio para estes elementos estiveram baixos. Concluise que a análise foi precisa, porém apresentou uma exatidão ruim. Essas diferenças não impedem o próximo passo de análise de homogeneidade, mas já prediz certas dificuldades para a certificação do referido material para tais elementos.

A homogeneidade é a estimativa de distribuição dos analitos de interesse em diferentes tamanhos de partícula. Estudos têm demonstrado que a heterogeneidade em pequenas amostras é provocada pela existência de partículas maiores, que podem apresentar concentrações mais altas de um determinado elemento, quando comparada as partículas menores presentes na mesma amostra (Zeisler, 1998).

A seguir nas figuras 2, 3, 4 e 5 observar-se os gráficos de homogeneidade nos tecidos de baço, coração, músculo e pulmão, para os diversos elementos onde a linha laranja representa um nível de confiança de 68%, mas indica uma exatidão maior do que a linha vermelha que representa nível de confiança de 95%, que foi o nível adotado para aprovar a homogeneidade. Todos os resultados encontram-se dentro desse do nível de confiança. Esse tipo de avaliação é comumente adotado para determinação de homogeneidade e foi utilizado por Carioni, na obtenção de resultados de homogeneidade para posteriores análises para certificação (Carioni, 2014). Para Kurfürst, a avaliação estatística foi parte fundamental de seus trabalhos, onde ele se baseia em tratamentos de dados sobre histogramas e níveis de confiança para rejeitar ou aceitar dados. (Kurfürst *et al.*, 1996).

Os valores de concentração na amostra de Baço (Figura 2) indicam que o Co e o As apresentam distribuições bastante exatas, pois os resultados ficaram dentro do nível de confiança de 68%, no entanto todas as amostras são homogêneas para o nível de confiança adotado. Já para a amostra de Coração (Figura 3), o Co e o Cu apresentaram as distribuições mais próximas da média, indicando a maior exatidão das amostras. Para a amostra de Músculo (Figura 4), todos os elementos apresentaram as distribuições próximas da média, indicando a maior exatidão entre todos os tecidos utilizados. E finalmente para a amostra de pulmão (Figura 5), testado em triplicata, indicou exatidão em todos os elementos, no entanto a amostragem foi pequena para essa análise, recomenda-se que seja maior em testes futuros.

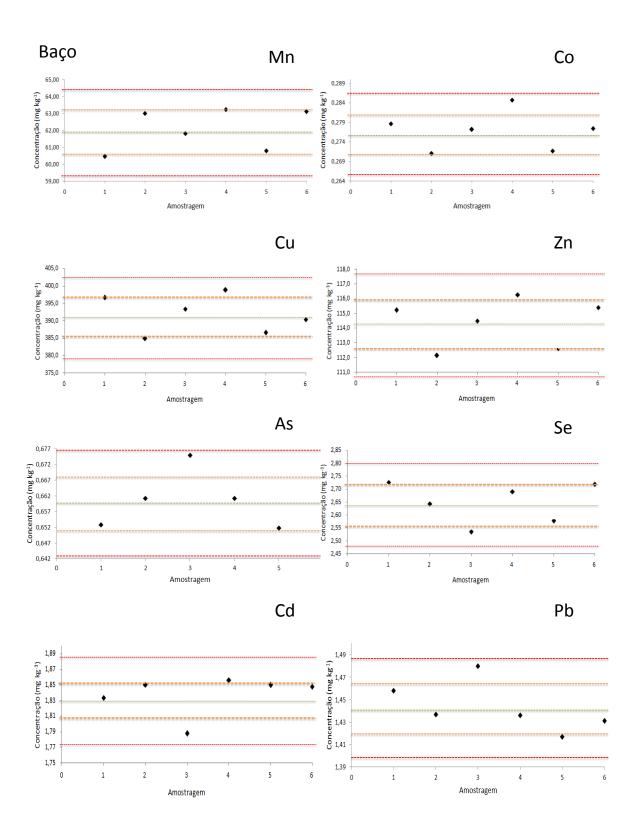


Figura 2. Avaliação da homogeneidade dos elementos químicos em Baço na amostra de carneiro (concentração mg.kg ⁻¹, n=6).

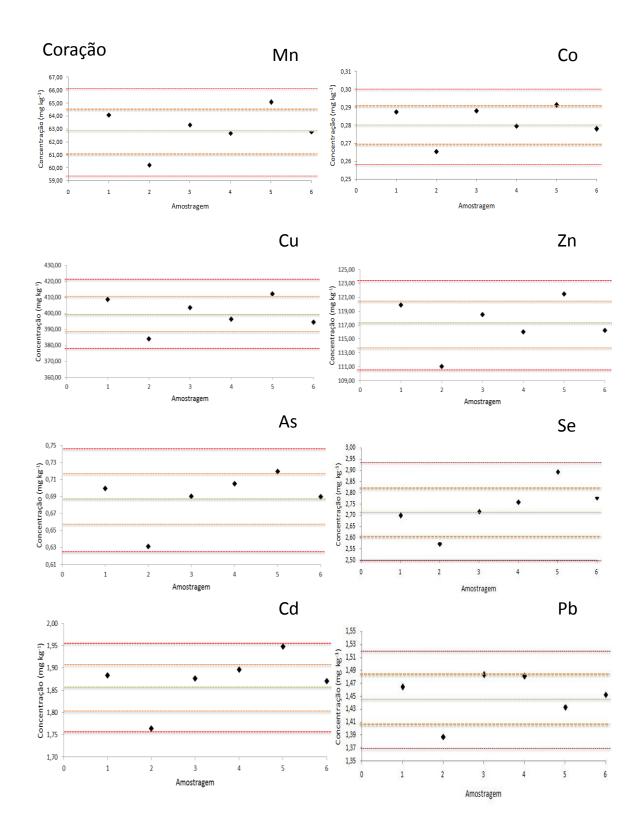


Figura 3. Avaliação da homogeneidade dos elementos químicos em Coração na amostra de carneiro (concentração mg.kg ⁻¹, n=6).

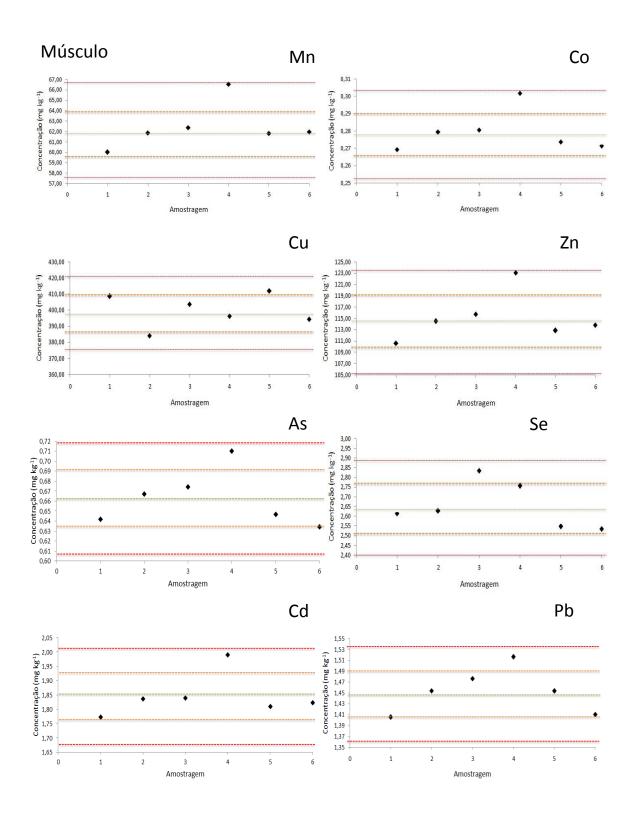


Figura 4. Avaliação da homogeneidade dos elementos químicos em Músculo na amostra de carneiro (concentração mg.kg ⁻¹, n=6).

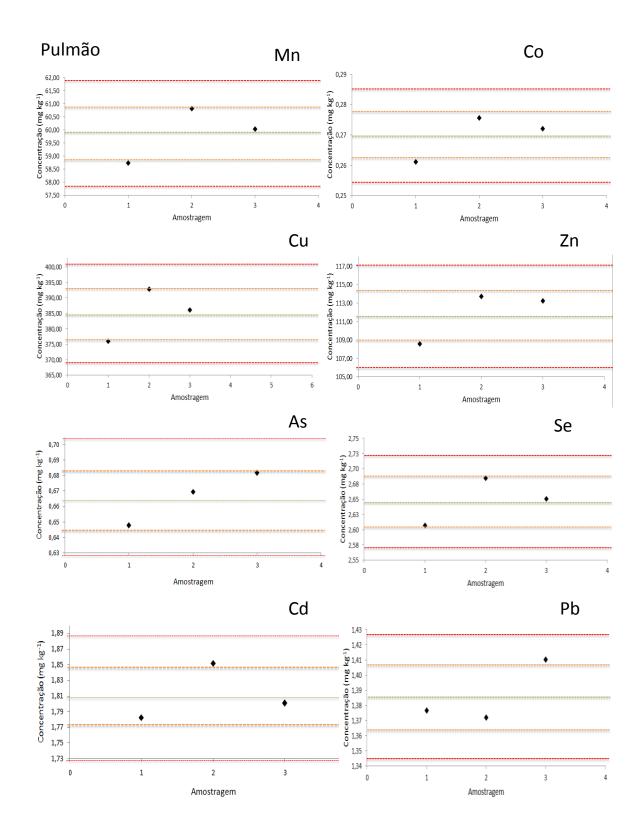


Figura 5. Avaliação da homogeneidade dos elementos químicos em Pulmão na amostra de carneiro (concentração mg.kg ⁻¹, n=3).

A homogeneidade suficiente de MRC em pó e amostras reais são considerados os requisitos mais importante para a escolha da massa mínima amostra representativa na análise elementar. (Kurfürst *et al.*, 1996)

Os resultados apresentados nas Figuras 2, 3, 4 e 5 indicam a homogeneidade adequada dos candidatos a RM de pulmão, baço, coração e músculo, visto que os resultados de Mn, Co, Cu, Zn, As, Se, Cd e Pb, são estatisticamente equivalentes em um limite de confiança de 95%.

4.2. Avaliação da distribuição de elementos tóxicos e essenciais em tecidos de carneiros (pulmão, baço, coração e músculo)

As análises das amostras apresentaram resultados de concentração para distribuição dos elementos tóxicos e essenciais que podem ser observados na Tabela 4. Os elementos escolhidos possuem características que se referem tanto ao nível toxicológico, que qualquer elemento apresenta ao ultrapassar o seu limite de tolerância para o ser humano ou a essencialidade que determina a sua importância para o bom funcionamento de qualquer organismo vivo.

O Arsênio (As) é considerado um dos elementos mais tóxicos para os seres humanos e animais. A exposição conduz a uma acumulação em tecidos como a pele, cabelo e unhas, resultando, por exemplo, em hiperpigmentação e queratose. Há também um risco maior para a pele e órgãos internos (JECFA, 2000; Mueller, 2004). Com base nesses efeitos tóxicos, o As foi incluído na presente pesquisa. Entre as amostras analisadas, a concentração de As variou entre 0,66 a 0,70 mg.kg⁻¹ para os diversos tecidos. O tecido que apresentou o maior valor foi o coração.

O Cádmio (Cd) é também um elemento altamente tóxico que tem seus efeitos tóxicos principalmente sobre o sistema renal, e causa danos aos rins. É necessário um tempo longo para que o cádmio acumulado nos rins seja excretado. Outros efeitos são diarreia, dores de estômago e vómitos, fragilidade óssea, insuficiência reprodutiva e, possivelmente, até mesmo infertilidade, danos no sistema nervoso central, os danos ao sistema imune e, desordens psicológicas (Mueller, 2004). Com base nesses efeitos tóxicos, JECFA estabeleceu o PTWI (Ingestão semanal tolerável) para este metal de 7µg.kg⁻¹ de peso corporal (JECFA 2000; WHO 2004). As concentrações Os níveis de Cádmio nas amostras variaram de

1,81 a 1,91 mg.kg $^{-1}$ O tecido que apresentou maiores quantidades de Cádmio foi o coração 1,91 \pm 0,04 mg.kg $^{-1}$, seguido do baço 1,85 \pm 0,01 mg.kg $^{-1}$ e o músculo e o pulmão apresentaram o valor de 1,81 \pm 0,04 mg.kg $^{-1}$.

O Chumbo (Pb) é outro elemento extremamente tóxico. Por isso a quantidade em alimentos consumidos não podem extrapolar certos limites. O Pb pode causar vários efeitos tóxicos como: perturbação da biossíntese da hemoglobina e anemia, aumento de pressão sanguínea, danos aos rins, abortos, alterações no sistema nervoso, danos ao cérebro, diminuição da fertilidade do homem através, diminuição da aprendizagem em crianças, modificações no comportamento das crianças , como agressão, impulsividade e hipersensibilidade (ICZ, 2012). Para o Pb os resultados foram maiores no coração 1,46 ± 0,02 mg.kg⁻¹, seguidos respectivamente por músculo 1,44 ± 0,03 mg.kg⁻¹ , baço 1,43 ± 0,01 mg.kg⁻¹ e finalmente por pulmão 1,39 ± 0,02 mg.kg⁻¹.

Para os elementos essenciais Mn, Co, Cu, Zn, Se, eles apresentam funções essenciais para a vida e desenvolvimento, consequentemente a sua falta também pode trazer prejuízos e diversas doenças. O Manganês (Mn) serve como um constituinte ativo de várias enzimas, incluindo antioxidantes (Prohaska, 1987). Em comparação com outros metais essenciais, ele é um dos elementos metálicos menos tóxicos do ponto de vista nutricional, não sendo conhecida toxidez natural em alimentos (Kataoka e Saito, 2011). No corpo humano o elemento pode ser encontrado concentrado nos rins e no fígado, no entanto maioria do elemento no corpo humano está armazenado nos ossos, com uma quantidade aproximada de 12 mg (Emsley, 2001; Gerber, Leonard e Hantson, 2002). Os resultados encontrados foram de 63,5 ± 1,3 mg.kg⁻¹ para a amostra de coração, seguido de baço 63,1 ± 0,1 mg.kg⁻¹, musculo 61,4 ± 1,2 mg.kg⁻¹ e pulmão 59,9 ± 1,0 mg.kg⁻¹.

O cobalto (Co) é um elemento essencial que em pequena quantidades é muito importante para numerosos organismos, incluindo os humanos. A presença de quantidades entre 0,13 e 0,30 mg.kg⁻¹ no solo melhora sensivelmente a saúde dos animais de pastoreio. Ele também é um componente central da vitamina B12 (cianocobalamina). Foram encontrados para a amostra de coração e músculo os valores de 0,28 ± 0,01 mg.kg⁻¹ e para o pulmão e baco 0,27 ± 0,01 mg.kg⁻¹.

O cobre (Cu) está presente na estrutura de várias enzimas, onde participa na extração de radicais livres de oxigénio do meio intracelular (Miguel, 2007) sendo um elemento essencial a vida, e no organismo humano ele é responsável pelo processo de fixação do ferro na hemoglobina do sangue, pode ser encontrado em grande quantidades no cérebro e no fígado (Komiyama *et al.*, 2003). Os resultados encontrados foram de $400.9 \pm 9.7 \text{ mg.kg}^{-1}$ para a amostra de coração, seguido de baço $396.3 \pm 2.8 \text{ mg.kg}^{-1}$, musculo $390.2 \pm 7.0 \text{ mg.kg}^{-1}$ e pulmão $385.0 \pm 8.5 \text{ mg.kg}^{-1}$.

O zinco (Zn) é um elemento essencial e desempenha um papel importante, estabilizando as estruturas de proteínas e ácidos nucleicos, também está envolvido no fenómeno imunológico com uma importante função de expressão do gene (Salgueiro *et al.*, 2000). O zinco é encontrado em diversos alimentos como ostras, carnes vermelhas, aves, alguns pescados, mariscos, favas e nozes. A ingestão diária recomendada de zinco é em torno de 10 mg para um adulto, devido ao peso corporal tem um valor menor para bebês, crianças e adolescentes, e maior para as mulheres grávidas e durante o aleitamento (Brown, 1990; Shils, 1994). Os resultados encontrados foram de 117,9 ± 3,1 mg.kg⁻¹ para a amostra de, seguido de baço 115,6 ± 0,6 mg.kg⁻¹ ,musculo 113,6 ± 2,7 mg.kg⁻¹ e pulmão 111,9 ± 2,8 mg.kg⁻¹

O selênio (Se) é um antioxidante, que ajuda a neutralizar os radicais livres, estimula o sistema imunológico e intervém no funcionamento da glândula tireóide. Mesmo sendo considerado elemento essencial, o mesmo pode provocar efeitos tóxicos caso exceda a ingestão de mais de 400 μg, a ingestão diária recomendada para adultos é de 55–70 μg. Sua carência nos humanos pode causar: esterilidade feminina, infecções, problemas de crescimento e insuficiência pancreática e seu excesso (em nível de nutriente) nos humanos pode causar: artrite, cansaço, halitose, irritabilidade, disfunção renal, desconforto muscular e pele amarelada (Christian, 1994; Shils,1994). Os resultados encontrados foram de 2,81 ± 0,07 mg.kg⁻¹ para o coração, seguido de músculo 2,69 ± 0,12 mg.kg⁻¹, baço 2,66 ± 0,08 mg.kg⁻¹ e pulmão 2,659 ± 0,04 mg.kg⁻¹.

Tabela 4. Valores de concentração (mg.kg⁻¹) dos analitos nos tecidos de carneiros.

Elemento	Pulmão	Baço	Coração	Músculo
Mn	59,9 ± 1,0	62,1 ± 1,2	63,0 ± 1,6	62,4 ± 2,2
Со	$0,27 \pm 0,01$	0.28 ± 0.005	0.28 ± 0.01	0,28 ± 0,01
Cu	$385,0 \pm 8,5$	391,8 ± 5,5	399,9 ± 10,3	395,1 ± 13,7
Zn	111,9 ± 2,8	114,4 ± 1,6	117,2 ± 3,6	115,1 ± 4,2
As	$0,66 \pm 0,02$	$0,66 \pm 0,01$	$0,69 \pm 0,03$	$0,66 \pm 0,03$
Se	$2,65 \pm 0,04$	$2,65 \pm 0,08$	$2,74 \pm 0,11$	$2,65 \pm 0,12$
Cd	1,81 ± 0,04	1,83 ± 0,03	1,86 ± 0,05	1,87 ± 0,08
Pb	$1,39 \pm 0,02$	$1,44 \pm 0,02$	$1,45 \pm 0,04$	$1,45 \pm 0,04$

Pela Tabela 4 podemos notar que a distribuição foi homogênea entre os tecidos e que os mesmos apresentaram valores em escala compatível com o tipo de elemento aos quais pertencem. Para os elementos essenciais (Mn, Co, Cu, Zn e Se) foi obtido para o Cobre uma concentração entre 385 ± 8,5 a 399,9 ± 10,3 mg.kg⁻¹ representando o maior valor apresentado da tabela, na sequência tem-se o Zinco com valores variando entre 111,9 ± 2,8 mg.kg⁻¹ a 117,2 ± 3,6 mg.kg⁻¹, Manganês com valores variando entre 59,9 ± 1,0 mg.kg⁻¹ a 62,1 ± 1,2 mg.kg⁻¹, Selênio com valores de 2,74 ± 0,11 mg.kg⁻¹ a 2,65 ± 0,04 mg.kg⁻¹ e finalmente o Co com valores de 0,27 ± 0,01 mg.kg⁻¹ a 0,28 ± 0,01 mg.kg⁻¹. Alguns elementos como o Co e o Se apresentam valores de acumulação muito próximos mesmo em diferentes tecidos especialmente no Cobalto onde os desvios também são muito pequenos indicando a precisão das medidas.

Para os elementos tóxicos (As, Cd e Pb) os resultados foram observados os menores valores depois do Co, condizendo com o esperado para elementos tóxicos, que eles estejam presentes em menor quantidades nos tecidos de origem animal.

Quanto á observação dos tecidos o coração teve a maior acumulação, que pode ser explicado pela quantidade de sangue ainda existente no tecido, no momento em que foi retirado cirurgicamente, a amostra de coração teve acumulação seguida pelo músculo, baço e pulmão, os resultados para o pulmão podem apresentar baixa exatidão devido ao número de amostragem que foi em triplicata e não em sextuplicata como os outros tecidos.

É importante ressaltar que ter esse tipo de matriz com elementos químicos pode ser utilizado para monitoramento de população e pesquisa na área, para que seja possível levar ao posto de material de referência certificado.

5. Conclusão

O método utilizado para a caracterização da homogeneidade intrafrascos mostrou que para as amostras de tecido de baço, coração, musculo e pulmão, a homogeneização utilizada para a amostra de carneiro se mostrou eficiente, de modo a apresentar para todos os elementos escolhidos valores dentro do intervalo de confiança de 95%.

A homogeneidade para um material de referência é considerado o requisito mais importante para a escolha da massa mínima representativa para ser usada em análise elementar, e a partir do momento em que a massa mínima representativa é obtida é possível seguir com os procedimentos necessários para seguir com os procedimentos para a certificação do material de referência.

A avaliação da distribuição de elementos tóxicos e essenciais pelo método de ICP-MS em tecidos de carneiros foi possível pela homogeneidade das amostras e apresentou uma distribuição homogênea entre os tecidos onde o coração é o tecido que mais acumula e teve maior valor em todos os elementos, exceto para Cádmio, seguido pelo músculo, baço e pulmão. Para alguns elementos individualmente foi possível notar valores de concentração muito próximos para todos os tecidos, demonstrando a reprodutibilidade das amostras e aproximando mais o material para uma futura certificação como material de referência. No entanto para As, Cd e principalmente para o Se os valores fugiram do esperado dificultando uma possível certificação.

A importância das ferramentas analíticas e estatísticas descritas neste trabalho para a certificação de CRMs é evidente. Durante a produção e preparo de amostra candidata a CRM as partículas devem ter polidispersão baixa, pois evita a presença de frações pequenas com muito alta concentração do analito e vice-versa. Uma vez que a homogeneidade intrafrasco se apresentou dentro do esperado, análises futuras vão ser realizadas como a análise entre frascos e, finalmente, estabilidade e distribuição para análise interlaboratorial para certificação.

6. Referências Bibliográficas

BARBOSA F., et al. Elevated blood lead levels in a riverside population in the Brazil Amazon. **Environ Res**, v.109, n.5, p.594-599, 2009.

BRIGHT, H. Standard Sample Program of National Bureau of Standards. **Anal. Chem.**, v.23, n.11, p. 1544-1547, 1951.

BROWN, M. L. **Present Knowledge in Nutrition**. **6 ed**. Washington: International Life Sciences Institute Press, 1990, 532p.

CARIONI, V. M. O. et al. Feasibility study for the preparation of a tuna fish candidate reference material for total As determination. **Accred. Qual. Assur.**, v.16, n.8, p.453-458, 2011.

CARIONI, V.M.O. Produção de candidato a material de referência de tecido de peixe para determinação de As, Cd e Cu de espécies de As. 123p. **Tese de doutorado** (Doutorado em Ciência e Tecnologia - Química). Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC, Santo André, 2014.

CAROLI, S. et al. A pilot study for the production of a certified reference material for trace elements in Honey. **Microchem. J.**, v. 67, n. 1-3, p. 227-233, 2000.

CHRISTIAN, G. D. Analytical chemistry. 5 ed. Washington: John Wiley and Sons, 1994, 812p.

De BIÈVRE, P. J. Looking back at two decades of "Metrology in Chemistry". **Accred. Qua. Assur**, v.16, n.12, p.591-596, 2011.

DRNOVSEK, J. On the specific experience of national metrology institutes (NMIs) with national accreditation bodies (NABs). **Accred. Qual. Assur.**, v.13, n.6, p.321-325, 2008.

EMSLEY, J. Nature's Building Blocks: An A-Z Guide to the Elements. Oxford: Oxford University Press, 2001, p.249-253.

GERBER, G.B.; LEONARD A.; HANTSON P. Carcinogenicity, mutagenicity and teratogenicity of manganese compounds. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, v.42, n.1, p.25-34, 2002.

GROTTO D. et al. Mercury exposure and oxidative stress in communities of the Brazilian Amazon. **Sci Total Environ**, v.408, n.4, p.806–81, 2010.

HEYDORN, K., Metrology in analytical chemistry: The definition of a measurand. **Accred. Qual. Assur.**, v.18, n.6, p.533-535, 2013.

HOWARTH, P. Metrology - in short. 1 ed. Lyngby: Notex Tryk & Amp, 2000, 56p.

ICZ, Instituto de Chumbo e Zinco. **Chumbo e a saúde**. 2012. Disponível em: http://www.icz.org.br/chumbo-saude.php>. Acesso em: 03/2016.

ISO Guide 30. Terms and definitions used in connection with reference materials, 2015.

JCGM 200, International vocabulary of metrology - Basic and general concepts and associated terms (VIM). 3 ed., 2012.

KAARLS, R. Metrology, essential to trade, industry and society. **Accred. Qual. Assur.**, v.12, n.8, p.435-437, 2007.

KATAOKA, H.; SAITO, K. Recent advances in SPME techniques in biomedical analysis. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 54, n.5, p.926-950, 2011.

KOMIYAMA, M. et al. **Molecular Imprinting: From Fundamentals to Applications**. Germany: Wiley Weinheim, 2003, 75p.

KURFÜST, U. et al. Micro-heterogeneity of trace elements in reference materials - determination and statistical evaluation. **Fresenius. J. Anal. Chem.**, v.345, n. 2, p.112–120, 1993.

KURFÜST, U. et al. Uncertainty in analytical results from solid materials with eletrothermal atomic absorption spectrometry: a comparison of methods. **Spectrochim. Acta, Part B.**, v.51, p. 229-244, 1996.

MEDICINA GERIÁTRICA GERIATRIA E GERONTOLOGIA. **Cobre - carência e excesso**. 2007. Disponível em: http://www.medicinageriatrica.com.br/2007/11/12/ion-cobre-carencia-e-excesso/>. Acesso em: 03/2016.

MUELLER, U. et al. Cadmium, in: Safety evaluation os certain food additives and contaminants. **World Health Organization**, v.64, p.305-380, 2004.

NARDI E.P., The use of inductively coupled plasmamass spectrometry (ICP-MS) for the determination of toxic and essential elements in different types of food samples, Food Chem. 112 (2009) 727–732.

PAUWELS, J. et al. The preparation of codfish candidate reference material to be certified for Pb, Cd, Hg, Fe, and Zn. **Fresenius. J. Anal. Chem.**, v.338, n. 4, p.515-519, 1990.

PROHASKA JR.. Function of trace elements in brain metabolism. **Physio. Rev.**, v. 67, p.858-901, 1987. QUEVAUVILLER, P, Requirements for production and use of Certified Reference Materials for speciation analysis: A European Commission perspective. **Spectrochim. Acta Part B: At. Spectrosc.**, v. 53, n. 9, p.1261-1279, 1998.

RICHTER, W. Comparability and recognition of chemical measurement results – an international goal. **Fresenius. J. Anal. Chem.**, v. 365, n. 7, p. 569-573, 1999.

SALGUEIRO, MJ. et al. Zinc as an essential micronutrient: a review. Nutr Res, v.20 p 737–755, 2000

SHILS, M. E. et al. **Modern Nutrition in health and disease. 18 ed**. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1994.

STOEPPLER, M.; WOLF, W. R.; JENKS, P. J. Reference materials for chemical analysis: certification, availability and proper usage. 1 ed. VHC: Wiley, 1999, 322p.

TAYLOR, P. et al. A strategy for a national metrology institute to create a cost effective distributed metrology infrastructure for chemical measurements. **Accred. Qual. Assur**, v.9, n.8, p.478-484, 2004.

TERRES-MARTOS C. et al. Determination of Cu levels in serum of healthy subjects by atomic absorption spectometry. **Sci. Total Environ.** v.198, p.97-103, 1997.

THOMPSON, M. et al. Protocolo Harmonizado para Ensaios de Proficiência. IUPAC, Pure and Applied Chemistry, v.78, p.145-196, 2006.

ZEISLER, R., Reference materials for small-sample analysis. **Fresenius J. Anal. Chem.**, v. 360, n. 3-4, p. 376–379, 1998.

Apêndice



National Bureau of Standards Certificate of Analysis

Standard Reference Material 1568a

Rice Flour

This Standard Reference Material (SRM) is intended primarily for calibrating instruments and evaluating the reliability of analytical methods for the determination of minor and trace elements in rice flour and similar agricultural food products.

Certified Concentrations of Constituent Elements: The certified concentrations of the constituent elements are shown in Table 1. Except for sulfur, the concentrations are based on results obtained by two or more independent, reliable analytical methods. Sulfur is certified based on its determination by a definitive method, isotope dilution thermal ionization mass spectrometry. Non-certified values, which are given for information only, appear in Table 2. All values are based on a minimum sample size of 500 mg and are reported on a "dry weight" basis. (See "Instructions for Drying").

Notice and Warnings to Users:

Expiration of Certification: This certification will be invalid after 5 years from the date of shipping. Should it be invalidated before then, purchasers will be notified by NBS.

Storage: The material should be kept in its original bottle and stored at temperatures between 10-30 °C. It should not be exposed to intense sources of radiation, including ultraviolet lamps or sunlight. Ideally, the bottle should be kept in a desiccator, in the dark at the temperature indicated.

<u>Use</u>: The following procedures should be followed to relate the analytical determinations to the values reported in this certificate. The bottle should be shaken well before each use, and a minimum sample of 500 mg of the material should be used. Mercury should be determined without drying and the concentration values adjusted for the moisture content of the material using separate samples. Other elements may be determined either on samples without drying as indicated above or on samples vacuum-dried for 24 hours as indicated under "Instructions for Drying."

Coordination of some technical measurements leading to this certificate was performed by M.S. Epstein of the Inorganic Analytical Research Division.

Statistical analysis of the experimental data was performed by K.R. Eberhardt of the NBS Statistical Engineering

The technical and support aspects involved in the preparation, certification, and issuance of this Standard Reference Material were coordinated through the Office of Standard Reference Materials by R. Alvarez.

Gaithersburg, MD 20899 January 20, 1988

Stanley D. Rasberry, Chief Office of Standard Reference Materials

(over)

Table 1. Certified Concentrations of Constituent Elements^a

Minor Elements

Element ^b	Concentration, Percent by Weight ^e	
Calcium ^{1a,2b} Magnesium ^{1a,2a,4a} Phosphorus ^{2a,2e,5} Potassium ^{2b,4a} Sulfur ^{3b}	0.153 ± 0.1280 ±	0.002 0.008

Trace Elements

Elementb	Concentration, µg/gc		
Aluminum ^{2a,4a} Arsenic ^{1c,4a} Cadmium ^{1b,4b} Copper ^{1a,4a,4b} Iron ^{1a,3b,4a}	4.4 0.29 0.022 2.4 7.4	± ± ± ± ±	1.0 0.03 0.002 0.3 0.9
Manganese ^{1a,4a} Mercury ^{1d,4b}	20.0 0.0058	±	1.6 0.0005
Molybdenum ^{ac,sa,va}	1.46	±	0.08
Rubidium ^{20,94}	6.14	±	0.09
Selenium ^{10,48}	0.38	±	0.04
Sodium ^{20,48}	6.6	\pm	0.8
Zinc ^{1a,4a}	19.4	\pm	0.5

^a Analytical values are based on the "dry-weight" of material (see "Instructions for Drying"). Mercury should be determined on samples without drying and the results adjusted to a "dry-weight" basis by determining moisture on separate samples.

- Analytical Methods

 1. Atomic Absorption Spectrometry

 - a. Flame
 b. Graphite Furnace
 c. Hydride Generation
 - d. Cold Vapor
 - Atomic Emission Spectrometry
 a. DC Plasma
- a. D.C. Flasma
 b. Flame
 c. Inductively Coupled Plasma
 3. Mass Spectrometry
 a. Isotope Dilution Inductively Coupled Plasma
 b. Isotope Dilution Thermal Ionization
 4. Neuton Activation Analysis
- - a. Instrumental b. Radiochemical
- 5. Spectrophotometry

b Number and letter code, as superscripts, indicate methods used for certification. (See "Analytical Methods").

^c The certified concentration is the weighted mean computed according to the procedure described by R.C. Paule and J. Mandel (NBS Journal of Research, <u>87</u>, 1982, pp. 377-385). The uncertainty is stated as a 95% confidence interval plus an additional allowance for systematic error among the methods used. The allowance for systematic error is the greatest difference between the weighted mean and the component means for the analytical methods used. For manganese, an additional allowance for material inhomogeneity is included, so that the uncertainty represents a 95% expected coverage statistical tolerance interval.

Table 2. Non-Certified Concentrations of Constituent Elements^a

NOTE: The values shown in this table are not certified because they are not based on the results of either two or more independent reliable methods or a definitive method of known high accuracy. These values are included for information only and therefore no uncertainty limits are provided.

Trace Elements

Element	Concentration, μg/g	Element	Concentration, μg/g
Antimony	(0.0005)	Lead	(<0.010)
Bromine	(8)	Tin	(0.0047)
Chlorine	(300)	Tungsten	(0.0012)
Cobalt	(0.018)	Uranium	(0.0003)
Iodine	(0.009)	Vanadium	(0.007)

^a Analytical values are based on the "dry-weight" of material (see "Instructions for Drying").

Preparation of Material: The rice flour for this Standard Reference Material was described by the supplier as 100% long grain from Arkansas. At NBS, the material was passed through a sieve with openings of 425 μm (No. 40) and blended. The bottled material was then subjected to 2.5 megarads of 60_{Co} radiation for microbiological control at Neutron Products, Inc., Dickerson, MD.

<u>Homogeneity Assessment</u>: A preliminary evaluation of the homogeneity was made by instrumental neutron activation using samples of approximately 500 mg. The uncertainties for the concentrations in Table 1 incorporate these results.

Instructions for Drying: Except for mercury, elements should be determined on samples that have been dried as follows:

Vacuum-dry the material at approximately 25 °C for 24 hours at a pressure not greater than 70 Pa (0.5 mm Hg) with a cold trap at a temperature of about -30 °C or below.

Mercury should be determined on undried samples. However, because the certificate values are reported on a "dry-weight" basis, the elemental concentration determined on undried samples should be adjusted for the moisture content of separately measured samples. The moisture content, which was approximately 8% when bottled, should be determined on separate samples by the vacuum-drying procedure described above. Samples for analysis should not be oven-dried lest elements be lost by volatilization.

Analysts, Analytical Chemistry Division, National Bureau of Standards

 E.S. Beary 	J.R. Moody
2. T.A. Butler	P.J. Paulsen
M.S. Epstein	11, T.C. Rains
J.D. Fassett	12, T.A. Rush
R.R. Greenberg	13. S.F. Stone
L.B. Jassie	R.L. Watters, Jr
W.R. Kelly	15. L.J. Wood
H.M. Kingston	

Cooperating Analysts

N.J. Miller-Ihli, Beltsville Human Nutrition Center, U.S. Department of Agriculture, Beltsville, MD. A.R. Byrne, M. Dermelj, and A. Vakselj, Institut "Jozef Stefan" Ljubljana, Yugoslavia.

-3-

Figura A. Certificado de análise para o material de referência de Arroz, contendo as concentrações dos analitos e seu desvio padrão, método de análise, preparação do material, e outros parâmetros, emitido pela NBS (National Bureau os Standards).