

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Instituto de Ciências Exatas**  
**Departamento de Química**

Guilhermina de Oliveira Souza

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UMA METODOLOGIA PARA  
DETERMINAÇÃO DE METAIS E METALOIDES EM TECIDOS ANIMAIS VIA  
DIGESTÃO ÁCIDA EM MICRO-ONDAS E ANÁLISE POR ICP-MS/MS**

Belo Horizonte

2023

UFMG/ICEX/DQ. 1.556

D. 847

Guilhermina de Oliveira Souza

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UMA METODOLOGIA PARA  
DETERMINAÇÃO DE METAIS E METALÓIDES EM TECIDOS ANIMAIS VIA  
DIGESTÃO ÁCIDA EM MICRO-ONDAS E ANÁLISE POR ICP-MS/MS**

Dissertação apresentada ao  
Departamento de Química do Instituto de  
Ciências Exatas da Universidade Federal  
de Minas Gerais, como requisito parcial  
para a obtenção do título de Mestre em  
Química.

Orientador: Prof. Guilherme Dias  
Rodrigues

Coorientadora: Prof. Clésia Cristina  
Nascentes

Belo Horizonte  
2023

#### Ficha Catalográfica

S719d  
2023  
D Souza, Guilhermina de Oliveira.  
Desenvolvimento e validação de uma metodologia para determinação de metais e metaloides em tecidos animais via digestão ácida em micro-ondas e análise por ICP-MS/MS [manuscrito] / Guilhermina de Oliveira Souza. 2023.  
109 f. : il., gráfs., tabs.

Orientador: Guilherme Dias Rodrigues.  
Coorientador: Clésia Cristina Nascentes.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais – Departamento de Química.  
Bibliografia: f. 101-109.

1. Química analítica – Teses. 2. Visceras – Teses. 3. Preparação de amostra (Química) – Teses. 4. Metais pesados – Teses. 5. Microondas – Teses. 6. Ácidos – Teses. 7. Decomposição química – Teses. 8. Espectrometria de massa – Teses. 9. Compostos orgânicos – Teses. 10. Elementos traços – Análise – Teses. I. Rodrigues, Guilherme Dias, Orientador. II. Nascentes, Clésia Cristina, Orientadora. III. Título.

CDU 043



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



**"Desenvolvimento e Validação de uma Metodologia para Determinação de Metais e Metalóides em Tecidos Animais via Digestão Ácida em Microondas e Análise por ICPMS-MS"**

**Guilhermina de Oliveira Souza**

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Guilherme Dias Rodrigues – Orientador  
UFMG

Profa. Clésia Cristina Nascentes – Coorientadora  
UFMG

Prof. Louise Aparecida Mendes  
UFOP

Prof. Ricardo Mathias Orlando  
UFMG

Belo Horizonte, 13 de julho de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Guilherme Dias Rodrigues, Professor do Magistério Superior**, em 13/07/2023, às 11:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento



Documento assinado eletronicamente por **Louise Aparecida Mendes, Usuária Externa**, em 13/07/2023, às 11:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Mathias Orlando, Professor do Magistério Superior**, em 14/07/2023, às 17:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento



Documento assinado eletronicamente por **Clesia Cristina Nascentes, Professora do Magistério Superior**, em 05/09/2023, às 20:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2462020** e o código CRC

Referência: Processo nº 23072.242807/2023-74

SEI nº 2462020

*À memória do meu amado pai.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e seu Filho Jesus Cristo que, sendo donos de todas as coisas, em sua infinita bondade quiseram que eu tivesse a graça de concluir mais essa etapa difícil, empolgante e importante da minha vida acadêmica. Ao Espírito Santo por encher meu coração e mente da paz que excede todo entendimento em inúmeros momentos em meio às mais diversas incertezas. “Ao único Deus, nosso Salvador, mediante Jesus Cristo, Senhor nosso, glória, majestade, império e soberania, antes de todas as eras, e agora, e por todos os séculos.” (Judas 25)

Ao meu pai (*in memoriam*) porque silenciosamente me ensinou que o trabalho diligente dá resultados. À minha mãe por sempre incentivar meu desejo de me aprimorar e avançar na caminhada. Às minhas irmãs porque sempre são um colo para chorar, ouvido para minhas palavras e pela amizade e lealdade até que não estejamos mais aqui. À minha pequena sobrinha por sua companhia infantil, amor puro e por me ensinar mais profundamente o significado do altruísmo. Aos meus cunhados pelas conversas divertidas e garantia de muitas risadas.

Aos meus amigos e irmãos, Professor Sunday Olusegun e sua amável esposa e filha, Christiana e Thais Olusegun, pela amizade leal, incontáveis ligações e orações, paciência, amor e por serem um farol nas águas mais escuras por que atravessei nesses últimos anos. À Cinthia que tanto me ajudou com caronas na volta para casa nos meses finais do desenvolvimento desse trabalho em que eu estava mais cansada e sobrecarregada de tarefas.

Aos companheiros do CRA, especialmente ao Igor Forattini e Dr. Thiago Marques, pela preciosa ajuda nas etapas de validação. Ao Matheus Alvarenga e Amanda Coelho por me ajudarem com o ICP-MS incontáveis vezes e porque foram uma companhia divertida e inestimável apoio, muitas vezes em algumas sextas feiras tarde da noite. À Liliane pela maturidade, graça e pelo início de uma amizade que levaremos para toda a vida.

Aos professores Clésia Nascentes e Guilherme Rodrigues, meus orientadores. Agradeço ao professor Guilherme pelo convite para trabalhar no Projeto Brumadinho, pela calma e conselhos em meio aos desafios diários. À professora Clésia por confiar em abrir as portas do laboratório para uma desconhecida trabalhar em um projeto tão desafiador, pelo carinho, paciência, conselhos e gentileza. Aos professores Ricardo Mathias Orlando, Louise Aparecida Mendes e Bruno Gonçalves Botelho que, gentilmente, aceitaram avaliar este trabalho.

Minha mais estimada gratidão à Ana Carolina, Fabiana, Lílian e Simone da Secretaria da Pós-Graduação por, pacientemente, me ajudarem diversas vezes com inúmeras dúvidas ao longo do curso e especialmente na marcação da minha defesa.

Agradeço à CAPES, FAPEMIG e à FUNDEP pelos recursos dedicados, ao Centro de Referência Ambiental, CRA-DQ-UFMG, pela oportunidade de acesso a equipamentos excelentes e abundantes recursos materiais e imateriais. Aos professores do Departamento de Química pelo ensino com excelência, à minha amada Universidade Federal de Minas Gerais por ser a gigante que é e por fazer parte de mais um capítulo singular da minha vida.

Enfim, agradeço a mim por sonhar muito, não me deixar abater pelos desafios e ousar ser quem eu sou. A conclusão desta etapa foi um marco na minha trajetória profissional e este trabalho representa o coroamento de uma fase que exigiu muito empenho e superação.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”. (Albert Einstein)

## RESUMO

Neste trabalho foi desenvolvido e validado um método para determinação de trinta e uma espécies químicas em amostras de fígado bovino via digestão ácida em micro-ondas e determinação por ICP-MS/MS. Na etapa de otimização do método foi empregado o uso do moedor Ultra Turrax® Tube Drive como estratégia de pré-tratamento das amostras e ácido nítrico diluído para digestão ácida em micro-ondas. A validação foi conduzida seguindo as diretrizes do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e os parâmetros avaliados foram linearidade, seletividade, efeito de matriz, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão, recuperação e robustez. Os LD e LQ do método variaram de 0,15 a 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 0,045  $\text{mg kg}^{-1}$  a 45  $\text{mg kg}^{-1}$ , respectivamente, a recuperação e precisão do método variaram entre 81 e 109% e no estudo de robustez concluiu-se que o método não sofre alterações significativas, portanto é considerado robusto. Finalizada a validação do método para amostra de fígado bovino, foram feitos experimentos para expansão de escopo em sangue e rim bovino, fígado e rim suíno, fígado de galinha, fígado, músculo e brânquias de peixe. A linearidade, seletividade, precisão e recuperação foram estudados para cada nova matriz adicionada e o método se mostrou adequado para determinação de metais, metaloides e terras raras em diferentes tecidos animais.

Palavras-chave: vísceras; Ultra-Turrax® Tube Drive; digestão ácida; ICP-MS/MS; validação.

## ABSTRACT

In this work, a method was developed and validated for the determination of thirty-one chemical species in bovine liver samples via microwave acid digestion and determination by ICP-MS/MS. In the method optimization step, the Ultra Turrax® Tube Drive grinder was used as a pre-treatment strategy for the samples and diluted nitric acid for acid digestion in microwave. Validation was conducted following the guidelines of the Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Supply (MAPA) and the evaluated parameters were linearity, selectivity, matrix effect, limit of detection (LD), limit of quantification (LQ), precision, recovery and robustness. The LD and LQ of the method varied from 0.15 to 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  and from 0.045  $\text{mg kg}^{-1}$  to 45  $\text{mg kg}^{-1}$ , respectively, the recovery and accuracy of the method varied between 81 and 109% and in the robustness study it was concluded that the method does not undergo significant changes, therefore it is considered robust. Once the validation of the method for a bovine liver sample was completed, experiments were carried out to expand the scope in bovine blood and kidney, porcine liver and kidney, chicken liver, fish liver, muscle and gills. Linearity, selectivity, accuracy and recovery were tested for each new additional matrix and the method is shown to be suitable for determination of metals, metalloids and rare earths in different animal tissues.

Keywords: viscera; Ultra-Turrax® Tube Drive; acid digestion; ICP-MS/MS; validation.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Descrição do moedor Ultra Turrax. (A) Botão Liga-Desliga. (B) Botão de ajuste de velocidade. (C) Botão Start-Stop. (D) Botão Timer: ajuste de unidades. (E) Botão Timer: ajuste de dezenas. (F) Display de tempo. ....26**
- Figura 2 - Tubos Ultra Turrax: (A) Tubos ST20 ou ST50 para homogeneização de soluções. (B) Tubos DT20 ou DT50 para homogeneização de tecidos. (C) Tubos BMT20 ou BMT50 moinho de bolas para decomposição de células animais. (D) Representação esquemática de um tubo.....27**
- Figura 3 - Esquema representativo de um ICP-MS: (1) amostra em solução; (2) bomba peristáltica; (3) nebulizador; (4) câmara de spray; (5) entrada de Ar para o plasma e refrigeração; (6) bobinas de indução/ tocha; (7) cone de amostragem; (8) skimmer; (9) lentes focalizadoras; (10) analisador de massas tipo quadrupolo; (11) detector tipo multiplicador de elétrons; (12) coletor de dados. ....32**
- Figura 4 - Representação esquemática de operação do ICPMS-MS na determinação da espécie  $A^+$ . ....33**
- Figura 5 - Desenvolvimento da moagem de fígado bovino Ultra Turrax. (A) amostra de fígado bovino in natura; (B) e (C): amostra de fígado cortada com faca; (D): tubo DT-20; (E): processamento Ultra-Turrax; (F): amostra processada no tubo DT-20 (teste 11); (G), (H) e (I): amostra de fígado bovino processada no tubo BMT-20; (J) e (K): amostra de fígado bovino processada em meio ácido nítrico 22% v v<sup>-1</sup> no tubo BMT-20; L: amostra de fígado de galinha processada em meio ácido nítrico 22% v v<sup>-1</sup> no tubo BMT-20. ....44**
- Figura 6 - Representação esquemática das etapas do teste de eficiência de moagem.....46**
- Figura 7 - Representação esquemática das etapas da otimização da digestão. ....48**

<b>Figura 8 - Representação esquemática das etapas de determinação da faixa de trabalho.....</b>	<b>50</b>
<b>Figura 9 - Representação esquemática das etapas envolvidas no preparo da matriz branca de fígado bovino. ....</b>	<b>58</b>
<b>Figura 10 - Representação esquemática das etapas envolvidas no experimento de linearidade e seletividade.....</b>	<b>62</b>
<b>Figura 11 - Representação esquemática das etapas de determinação do LD e LQ. ....</b>	<b>65</b>
<b>Figura 12 - Representação esquemática das etapas de estudo da precisão do método. ....</b>	<b>69</b>
<b>Figura 13 - Moagem rim suíno. (A) Lóbulos do rim. (B) rim cortado (C) rim suíno processado no Ultra Turrax Tube Drive®. ....</b>	<b>74</b>
<b>Figura 14 - Determinação de carbono orgânico total.....</b>	<b>81</b>
<b>Figura 15 - (A) resposta instrumental vs concentração (B) Anderson-Darling: distribuição aleatória dos resíduos homoscedásticos (C) Durbin-Watson: Independência de resíduos (D) Levene: Normalidade dos resíduos do <sup>59</sup>Co. ....</b>	<b>83</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Técnicas de pré-tratamento e homogeneização de tecidos animais	25
Tabela 2 - Emprego do UltraTurrax (R) Tube Drive na homogeneização de tecidos animais.....	27
Tabela 3 - Emprego do ICP-MS para determinações em matrizes alimentícias.	33
Tabela 4 - Critérios de aceitação da reprodutibilidade .....	38
Tabela 5 - Esquema de adição de reagentes .....	47
Tabela 6 - Condições experimentais de operação do ICP-MS/MS .....	51
Tabela 7 - Valores de recuperação, repetitividade e reprodutibilidade .....	65
Tabela 8 - Fatores estudados na robustez.....	70
Tabela 9 - Condições experimentais no estudo de robustez .....	71
Tabela 10 - Estudo de homogeneização no tubo DT-20.....	78
Tabela 11 - Estudo de homogeneização no tubo BMT-20.....	79
Tabela 12 - Recuperação teste de fortificação (%) .....	80
Tabela 13 - Equação de regressão linear e coeficiente de correlação linear da curva em meio ácido nítrico 5% vv-1.....	82
Tabela 14 - Equação de regressão linear e coeficiente de correlação linear da curva em meio digerido de amostra branca .....	84
Tabela 15 - Parâmetros obtidos na avaliação dos limites de detecção e quantificação .....	86

<b>Tabela 16 - Parâmetros obtidos na avaliação da repetitividade, precisão intermediária e exatidão .....</b>	<b>88</b>
<b>Tabela 17 - Resultado do estudo de robustez .....</b>	<b>89</b>
<b>Tabela 18 - Parâmetros obtidos na avaliação da linearidade, seletividade, precisão e recuperação em sangue bovino .....</b>	<b>90</b>
<b>Tabela 19 - Parâmetros obtidos na avaliação da linearidade, seletividade e precisão e recuperação em fígado de galinha.....</b>	<b>91</b>
<b>Tabela 20 - Parâmetros obtidos na avaliação da linearidade, seletividade e precisão e recuperação em fígado suíno.....</b>	<b>92</b>
<b>Tabela 21 - Parâmetros obtidos na avaliação da linearidade, seletividade e precisão e recuperação em fígado de tilápia .....</b>	<b>93</b>
<b>Tabela 22 - Parâmetros obtidos na avaliação da linearidade, seletividade e precisão e recuperação em rim bovino.....</b>	<b>94</b>
<b>Tabela 23 - Parâmetros obtidos na avaliação da linearidade, seletividade e precisão e recuperação em rim suíno .....</b>	<b>95</b>
<b>Tabela 24 - Parâmetros obtidos na avaliação da linearidade, seletividade e precisão e recuperação em musculatura de tilápia .....</b>	<b>96</b>
<b>Tabela 25 - Parâmetros obtidos na avaliação da linearidade, seletividade e precisão e recuperação em brânquia de tilápia.....</b>	<b>98</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu$ L: microlitros

FAAS: Flame Atomic Absorption Spectrometry

GF AAS: Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry

mL: mililitros

ICP-MS: Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry

ICP OES: Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy

LMDR: limite mínimo de desempenho requerido

LMR: limites máximos permitidos

LD: limite de detecção

LQ: limite de quantificação

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

PFA: perfluoroalcoxiacano

RSD: desvio padrão relativo (*relative standard deviation*)

TMC: teor máximo de contaminante

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 Bioacumulação e biomarcadores .....	20
2.2 Análise de metais em tecidos animais .....	24
2.2.1 Pré-tratamento e homogeneização das amostras.....	25
2.2.2 Digestão assistida por micro-ondas .....	28
2.2.3 Determinação via ICP-MS .....	30
2.3 Requisitos Mínimos de Validação .....	34
2.3.1 Faixa de trabalho, linearidade e curva de calibração .....	35
2.3.2 Seletividade e efeito de matriz .....	36
2.3.3 Limite de detecção e limite de quantificação.....	37
2.3.4 Precisão .....	37
2.3.5 Veracidade e recuperação .....	38
2.3.6 Robustez.....	39
2.3.7 Expansão de escopo.....	40
3 OBJETIVO .....	41
3.1 Objetivos específicos.....	41
4 METODOLOGIA .....	42
4.1 Instrumentação e materiais .....	42
4.2 Reagentes e soluções.....	42
4.3 Procedimentos experimentais .....	43
4.3.1 Otimização da moagem .....	43
4.3.2 Teste da eficiência de moagem .....	44
4.3.3 Otimização da digestão.....	46
4.3.4 Estudos de Validação .....	48
4.3.4.1 Determinação da faixa de trabalho.....	49

4.3.4.2 Linearidade.....	51
4.3.4.3 Seletividade e efeito de matriz .....	57
4.3.4.3.1 Preparo da matriz branca a partir do fígado bovino .....	57
4.3.4.3.2 Estudo da seletividade e efeito de matriz.....	59
4.3.4.4 Limite de detecção e quantificação .....	62
4.3.4.5 Precisão .....	66
4.3.4.5.1 Repetitividade .....	66
4.3.4.5.2 Precisão intermediária.....	68
4.3.4.6 Veracidade: Recuperação .....	69
4.3.4.7 Robustez .....	70
4.3.5 Expansão de escopo.....	73
4.3.5.1 Preparo da matriz branca de tecidos animais .....	73
4.3.5.2 Preparo da matriz branca de sangue bovino .....	74
4.3.5.3 Linearidade.....	75
4.3.5.4 Seletividade e efeito de matriz .....	76
4.3.5.5 Precisão: repetitividade.....	77
4.3.5.6 Veracidade: recuperação .....	77
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	78
5.1 Otimização da moagem Ultra Turrax ®.....	78
5.2 Otimização dos parâmetros ácidos de digestão.....	79
5.3 Linearidade .....	81
5.4 Seletividade e efeito de matriz .....	84
5.5 Limite de detecção e quantificação .....	85
5.6 Precisão e recuperação .....	87
5.7 Robustez .....	89
5.8 Expansão de Escopo .....	89
6 CONCLUSÃO .....	100

REFERÊNCIAS .....	101
-------------------	-----

## 1. INTRODUÇÃO

Ao longo dos últimos anos, os interesses sobre os efeitos da poluição antropogênica nos ecossistemas têm crescido, e os metais potencialmente tóxicos provenientes de atividades humanas são continuamente lançados em ecossistemas terrestres e aquáticos e podem se tornar um problema por causa da bioacumulação na cadeia alimentar (DEMIREZEN, D. E URUC, K, 2006)

Os metais potencialmente tóxicos são conhecidos como contaminantes para carne e vísceras e a acumulação desses metais nos diferentes organismos, incluindo gado, pode ser uma possível fonte de contaminação através do consumo desses produtos, portanto se faz necessário monitorar metais e metaloides em carnes e vísceras bovinas, especialmente fígado e rim, por se tratar de fontes importantes de microelementos essenciais na dieta humana e carregarem metais potencialmente tóxicos como resíduos (HASHEMI, M., 2018).

Seguindo esta tendência de necessidade de informações sobre a ocorrência desses elementos, tóxicos ou não, em materiais biológicos, muitos procedimentos analíticos têm sido desenvolvidos. A etapa de pré-tratamento físico e/ou químico das amostras é geralmente necessária na maioria dos métodos analíticos, uma vez que a grande parte das técnicas requer que a amostra sólida seja transformada em uma solução homogênea (CARRILHO et al, 2002). Os métodos para preparo de amostras mais empregados consomem muito tempo e requerem grandes quantidades de reagentes, que são caros e geram resíduos perigosos, além de terem maior potencial de contaminar as amostras contendo os analitos (KORN et al, 2008). Atualmente, os procedimentos de digestão assistida por micro-ondas são amplamente utilizados em muitos laboratórios e podem ser considerados como o estado da arte para digestão de amostras, especialmente para as amostras cuja matriz é orgânica (BIZZI et al, 2014). Entre as razões para sua ampla difusão podem ser citados: tempo menor de digestão ácida, melhores recuperações de elementos e compostos voláteis, menores níveis de contaminação, volumes mínimos de reagentes para obtenção de digestão completa, procedimentos com maior reprodutividade e melhores ambientes de trabalho (AGAZZI, A. e PIROLA, C., 2000).

Os metais e metaloides são rotineiramente determinados em amostras alimentícias por meio da técnica ICP-MS, Espectrometria de Massas com Plasma Acoplado Indutivamente, uma vez que ela oferece muitas vantagens sobre outras

técnicas instrumentais como Absorção Atômica (FAAS), Forno de Grafite (GF-AAS) e a Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Acoplado Indutivamente (ICPOES) (DJEDJIBEGOVIC et al, 2011). O ICP-MS é uma técnica bem conhecida por sua capacidade de determinação simultânea multi-elementar, baixos limites de detecção, ampla faixa linear, obtenção de espectros mais simples, além de menor suscetibilidade a efeitos de matriz e interferências espectrais, portanto, se torna uma excelente escolha quando se trata de determinação em diversas áreas (AMAIIS et al, 2015).

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Bioacumulação e biomarcadores

Os diferentes tipos de metais podem ocorrer de muitas formas, dentre as quais pode-se citar os íons dissolvidos em água, naturalmente na forma de sais, minerais e no solo. Esses metais podem estar ligados a moléculas orgânicas e inorgânicas ou mesmo associadas a partículas no ar. Tanto os processos naturais quanto os antropogênicos emitem metais no ar e na água (GAUTAM; AGRAWAL, 2022).

O termo metal pesado atualmente é pouco usual, sendo mais corretamente substituído por metais potencialmente tóxicos. Mesmo assim, o termo ainda é utilizado e faz referência a um grupo de elementos com densidade maior que  $4 \text{ g cm}^{-3}$ , incluindo metais e metaloides como arsênio (VAREDA et al, 2019). Embora muitos sejam de ocorrência natural e alguns deles sejam biologicamente essenciais, como é o caso do cobre, ferro, níquel, cobalto, zinco, manganês e cromo, o aumento nas taxas de poluição tem feito aumentar a concentração desses elementos nos ambientes naturais para concentrações perigosas (VAREDA et al, 2019; SHEIKHZADEH, H., & HAMIDIAN, A. H, 2021).

Esses metais são considerados como contaminantes críticos considerando sua toxicidade, não degradabilidade, natureza bioacumulativa e alto potencial para biomagnificação ao longo da cadeia alimentar (MUHAMMAD, S.; SHAH, M. T., SARDAR, K., 2011; SHEIKHZADEH, H., & HAMIDIAN, A. H, 2021).

A ocorrência desses metais potencialmente tóxicos em ecossistemas aquáticos é um dos aspectos mais sensíveis relacionados à saúde pública e ao meio ambiente, especialmente em muitos países e regiões nos quais a única fonte de água para uso doméstico e na agricultura advém de águas subterrâneas (MUKHERJEE et al, 2020). Esses metais podem ser derivados tanto de fontes naturais, as quais incluem intemperismo e erosão de rochas e depósitos minerais e deposições atmosféricas, quanto de fontes antropogênicas, tais como mineração, indústria, águas residuais, drenagem agrícola, descargas de esgoto doméstico e de efluentes industriais e vazamentos acidentais de produtos químicos (WAEGENEERS et al, 2009; DJEDJIBEGOVIC et al, 2011, CHUA et al, 2018, SHEIKHZADEH, H., & HAMIDIAN, A. H, 2021) A descarga de efluentes em sistemas aquáticos contamina águas superficiais e subterrâneas e afeta a comunidade ecológica e os organismos vivos

(MUHAMMAD, S.; SHAH, M. T., SARDAR, K., 2011; PACKETT et al, 2009). Dessa forma, a segurança dos ecossistemas aquáticos é uma questão importante devido ao papel central que esses ecossistemas desempenham no fornecimento de água e alimentos para os seres humanos e habitat para outros organismos (SHEIKHZADEH, H., & HAMIDIAN, A. H, 2021).

Atualmente, a poluição do solo por metais pesados também figura entre as questões ambientais mais importantes. De acordo com inúmeros estudos científicos, os metais são considerados como substâncias perigosas liberadas a partir de atividades antropogênicas exibindo o risco para o ambiente circundante e para a saúde humana. (WEISSMANNOVÁ, H. D., & PAVLOVSKÝ, J., 2017).

As atividades antropogênicas são a principal causa de poluição orgânica e inorgânica nos solos. Esses metais são acumulados no solo principalmente devido a deposição seca e úmida advindas de diversas fontes, sendo a principal e mais importante relacionadas a emissões das indústrias química, metalúrgica, fundição, de construção e de eletrônicos, combustíveis e gestão e transporte de resíduos, além de fontes difusas de contaminação oriundas de aterros sanitários, acampamentos militares e usinas nucleares (CHEN et al, 2000; PANAGOS et al, 2013; WEISSMANNOVÁ, H. D., & PAVLOVSKÝ, J., 2017).

Consequentemente, essas atividades aumentam o fluxo de metais que podem ser transportados pelo vento e pela água e, assim, encontram seu caminho para as plantas, animais e, finalmente, para os seres humanos (GAUTAM et al, 2022). A implicação dos solos para a saúde humana é direta, como ingestão, inalação, contato com a pele e absorção dérmica (PANAGOS et al, 2013). As concentrações crescentes de tais poluentes estão deteriorando a saúde do solo, o que afeta variável e invariavelmente a produtividade do ecossistema e, nesse contexto, os organismos vivos são os indicadores mais adequados para monitorar as mudanças na dinâmica do solo (GAUTAM et al, 2022) dessa forma, o monitoramento das concentrações de metais na biota pode fornecer algum entendimento sobre a concentração dos metais biodisponíveis no ambiente.

Riscos ecológicos advindos desses contaminantes são difíceis de documentar porque as respostas diferem entre espécies, as toxicidades dos metais são diferentes e as influências ambientais são complexas. A bioacumulação é um bom indicador da exposição química de organismos em ecossistemas poluídos. Sendo que a bioacumulação de metais e metalóides representa um significado particular como

indicador de exposição porque metais não são metabolizados. Entretanto, sua bioacumulação pode ser complexa e é influenciada por múltiplas rotas de exposição e efeitos geoquímicos sobre a biodisponibilidade. Muitos são os padrões de acumulação entre as espécies. Dentre eles, podem ser citados a regulação das concentrações corporais de alguns metais por algumas espécies e diferença de concentração entre as espécies e ambientes (LUOMA e RAINBOW, 2005).

Os peixes são uma parte importante da dieta humana, mas também funcionam como bons indicadores de poluição em ecossistemas aquáticos (DJEDJIBEGOVIC et al, 2011). O estudo de alguns tecidos das espécies de peixes *Aldrichetta forsteri* (tainha olho-amarelo) e *Sillago schomburgki* (badejo albacora) tem se mostrado útil no emprego do monitoramento de alguns metais poluentes, tais como cádmio, cobre e chumbo. (EDWARDS et al, 2001). Birungi e colaboradores reportaram que tecidos de espécies de *Oreochromis niloticus* (tilápia do nilo) coletados de uma área poluída por efluentes industriais acumularam concentrações muito maiores de metais do que aqueles coletados de áreas de controle. Esses animais são de grande interesse de estudo porque podem bioacumular metais em seus tecidos em quantidades até muitas centenas de vezes acima das concentrações ambientais (RAINBOW, 1995) com uma tendência de acumulação de metais em órgãos vitais tais como brânquias, rins e fígado (UREN-WEBSTER et al., 2013) enquanto a concentração de metais e metalóides é geralmente muito mais alta nas vísceras que nas carcaças dos peixes. (CHUA et al, 2018). Muitos fatores, tais como tamanho, sexo, ciclo reprodutivo, hábitos alimentares, padrões de natação e ambiente são significantes em bioacumulação de metais e a variação de concentração dos metais pode nos tecidos dos peixes pode variar de entre diferentes espécies e órgãos. (M. PRAGNYA, et al, 2020).

Nesse contexto, pássaros e aves são bioindicadores muito úteis porque elas integram condições de exposição temporais e espaciais. Uma vez que as aves estão comumente no topo da cadeia alimentar, elas são de grande importância para monitoramento ambiental. Os níveis de poluentes são dependentes da dieta, intensidade da exposição, do tempo vivido em um determinado *habitat* e de vários tipos de disfunções fisiológicas. (HORAI et al, 2007). Uma vez ingerido, o metal pode ser armazenado nos tecidos internos, tais como rins e o fígado, ou pode ser excretado. Os níveis de metais no sangue refletem diretamente a dieta e a idade do animal - em aves adultas essas concentrações são mais altas que em filhotes - enquanto no fígado e rins elas estão relacionadas aos metais transportados pelas proteínas do sangue

onde são armazenados e tendem a se acumular ao longo do tempo (EK et al, 2003). As aves podem ser expostas a metais pesados tanto externamente, por contato físico, quando internamente pelo consumo de alimento contaminado (MARKOWSKI et al, 2013). Uma vez que as aves estão comumente no topo da cadeia alimentar, elas são de grande importância para monitoramento ambiental. Os níveis de poluentes são dependentes da dieta, intensidade da exposição, do tempo vivido em um determinado *habitat* e de vários tipos de disfunções fisiológicas (HORAI et al, 2007).

Outro grupo importante de animais a serem estudados, no que diz respeito a ocorrência de metais, são os bovinos, suínos, equinos e ovinos. Sabe-se que a carne, fígado e rins desses animais são importantes fontes de microelementos essenciais na dieta humana mundo afora, dentre os quais se pode citar ferro, zinco, cobre e selênio. (HASHEMI, M., 2018). Embora a carne e seus derivados sejam parte importante da dieta humana (PAßLACK et al, 2014; MORSHDY et. al 2018) os níveis de metais tóxicos são geralmente baixos na musculatura enquanto fígado e rins frequentemente acumulam concentrações mais altas desses metais (ALONSO et al, 1999). Um dos maiores impactos da poluição ambiental para humanos é a ingestão de substâncias tóxicas na dieta uma vez que o seu acúmulo em animais é reconhecidamente como um perigo para a saúde humana (KHALAFALA et al, 2011). Sabe-se que os metais tóxicos, incluindo chumbo, cádmio, mercúrio e arsênio são rapidamente transferidos por meio da cadeia alimentar assumindo enorme risco para os consumidores (YABE, J., et al, 2012).

Além do controle de qualidade da carne e outros tecidos comestíveis desses animais outro aspecto importante pode ser discutido no que diz respeito à determinação de metais tóxicos em vísceras de gado bovino, suíno, equino e ovino. Os equinos podem ser importantes como indicadores de poluição ambiental, uma vez que esses animais são herbívoros e essas plantas podem facilmente incorporar elementos advindos da água, ar ou solo (PAßLACK et al, 2014). Em um estudo realizado na China em 2009, Cai e colaboradores analisaram cádmio e chumbo em amostras de fígado e rins bovino criados em uma área próxima à atividades de fundição e concluíram que o esses metais podem ser usados como biomarcadores para segurança ecológica (CAI et al, 2009). Miranda e colaboradores avaliaram amostras de fígado, rins, músculo e sangue de animais oriundos de áreas industriais e rurais encontrando resultados significativos por meio dos quais puderam concluir que esses tecidos podem ser empregados como biomarcadores em estudos

ambientais (MIRANDA et al, 2005,). Em outro estudo conduzido na Nigéria, Nwude e colaboradores avaliaram os níveis de arsênio, cádmium, cromo, níquel e chumbo em amostras de fígado, rins, músculo e sangue de vaca e concluíram que os níveis de metais encontrados podem ser usados como biomarcadores (NWUDE et al, 2011).

A efetividade e confiabilidade da avaliação da poluição ambiental por meio dos níveis de metais como biomarcadores em organismos vivos como depende de vários fatores tais como o tipo de espécie, idade e sexo do animal (PARKER e HARM, 2001), do tipo de tecido avaliado (MIRANDA et al, 2009) bem como das condições ambientais, alimentação e características genéticas do organismo exposto (DILEK DEMIREZEN e URUC, 2006). Tais indicadores biológicos têm se tornado muito comuns e têm sido muito úteis devido à alta sensibilidade dos organismos vivos às mudanças dos componentes e condições ambientais que constituem sua vida. Entretanto, diferentes organismos respondem a diferentes níveis de mudanças em alguns parâmetros ambientais, além do mais, a biodiversidade precisa ser bem compreendida ao considerar biomarcadores ambientais (NWUDE et al, 2011).

Bioindicadores são organismos ou grupos de organismos cuja ocorrência ou sua reação facilmente reconhecível a estímulos ambientais está correlacionada a condições ambientais específicas, de modo a fornecer informações sobre o estado desse ambiente. Essa reação particularmente significa um processo de acumulação de xenobióticos, os quais são compostos químicos estranhos e prejudiciais aos organismos e esses últimos, quando acumulam essas espécies químicas proporcionalmente às quantidades disponíveis em determinado ecossistema, são chamados bioindicadores de acumulação (DMOWSKI et al, 1999).

## **2.2 Análise de metais em tecidos animais**

Uma vez compreendida a possibilidade de alguns tecidos animais acumularem quantidades de poluentes metálicos faz-se necessário o desenvolvimento de um método analítico eficiente para determinação desses elementos nessas matrizes e esse método deve contemplar pré-tratamento e digestão adequados bem como determinação dos analitos por meio de uma técnica instrumental.

### 2.2.1 Pré-tratamento e homogeneização das amostras

Para que a digestão da amostra seja eficiente, o seu pré-tratamento precisa ser feito de maneira cuidadosa para garantir boa homogeneidade. Os métodos mais empregados nessa etapa são a digestão da amostra fresca e em outros casos, pulverizada. Na Tabela 1 estão resumidos alguns trabalhos nos quais foram empregadas diferentes técnicas de pré-tratamento e homogeneização de amostras de vísceras animais.

Tabela 1 - Técnicas de pré-tratamento e homogeneização de tecidos animais

<b>Amostra</b>	<b>Técnica</b>	<b>Referência</b>
Rins, fígado e sangue suíno	Tecidos frescos	Györi et al, 2005.
Músculo, rim, fígado bovino	Secagem a 70 °C Trituração em gral e pistilo	Adetunji, V. O.; Famakin, V. O. e Chen, J., 2014.
Músculo de peixe	Secagem a 40°C até massa constante Trituração em gral e pistilo	Griboff, J.; Wunderlin, D.A. e Monferran, M. V., 2016.
Músculo de peixe	Secagem entre 60 e 65°C até massa constante Pulverização em moinho	Fallah et al, 2011.
Fígado, brânquias, intestinos e músculo de peixes	Liofilização e pulverização	Jaric et al, 2011
Músculo de peixe	Liofilização e pulverização	Adani, P., Sawate, A. Nandhagopal, G., 2021
Músculo, fígado e rins de veado	Secagem a 105°C por 24 h	Garcia et al, 2011.
Fígado caprino	Liofilização e pulverização	Kruger, P.C.; Geraghty, C.M., Parsons, P. J., 2010.
Músculo, fígado e rins de vacas, porcos, galinhas e patos	Liofilização e pulverização	Kim et al, 2011

Fonte: (Autor)

Embora a liofilização seja um método amplamente empregado, ele demanda muito tempo e posterior pulverização da amostra o que contribui para o aumento dos custos da análise, sem mencionar o gasto com energia elétrica e possibilidade de contaminação da amostra.

Considerando esses aspectos, outras formas de homogeneização de tecidos animais, mais rápidas e baratas carecem de ser estudadas. Uma alternativa a ser considerada é o UltraTurrax Tube Drive<sup>®</sup>, que consiste em um sistema universal de

dispersão, agitação, homogeneização e moagem com tubos descartáveis e hermeticamente seláveis. Nesse equipamento os tubos são facilmente conectados ao rotor e pode-se definir a velocidade e a duração de rotação desejados nos testes. Esse equipamento permite homogeneizar e diversos tipos de matrizes em um único passo e obter resultados reprodutíveis (STURM et al, 2018).

O equipamento possui três tipos diferentes de tubos conforme mostrado na figura 1. O tubo ST-20 ou ST-50, *stirring tube*, é usualmente empregado no preparo de misturas, extrações e suspensões. O tubo DT-20 ou DT-50, *dispersion tube*, é utilizado para dispersão e homogeneização de amostras de diferentes tipos de tecidos animais e vegetais. O tubo BMT-20 ou 50, *ball milling tube*, é empregado na pulverização de amostras secas de diferentes matrizes.



Figura 1 - Descrição do moedor Ultra Turrax. (A) Botão Liga-Desliga. (B) Botão de ajuste de velocidade. (C) Botão Start-Stop. (D) Botão Timer: ajuste de unidades. (E) Botão Timer: ajuste de dezenas. (F) Display de tempo.

(Fonte: IKA UltraTurrax Tube Drive®)

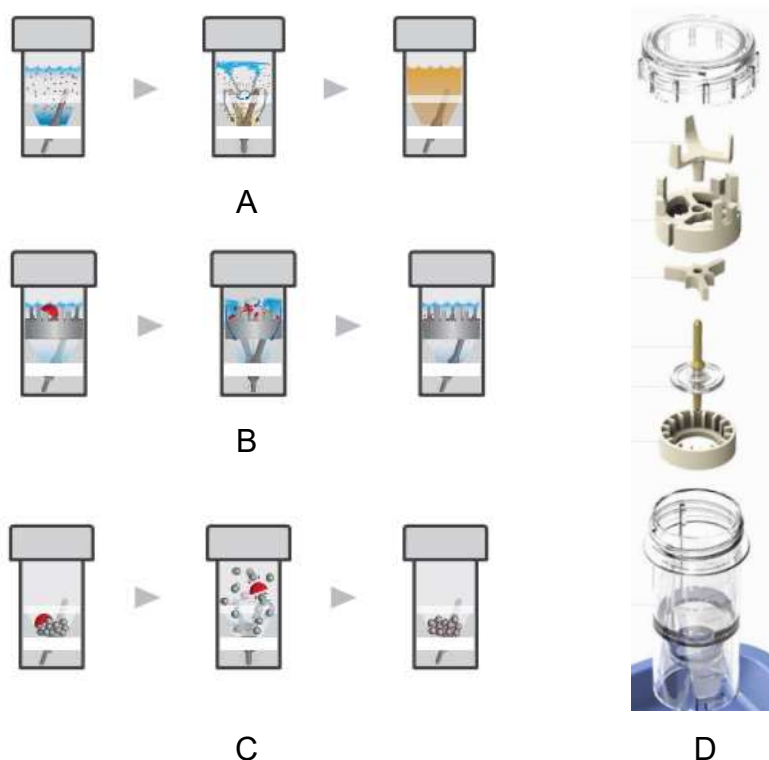


Figura 2 - Tubos Ultra Turrax: (A) Tubos ST20 ou ST50 para homogeneização de soluções. (B) Tubos DT20 ou DT50 para homogeneização de tecidos. (C) Tubos BMT20 ou BMT50 moinho de bolas para decomposição de células animais. (D) Representação esquemática de um tubo.

(Fonte: IKA UltraTurrax Tube Drive®)

A Tabela 2 resume alguns trabalhos nos quais o UltraTurrax Tube Drive® para homogeneizar amostras de tecidos animais.

Tabela 2 - Emprego do UltraTurrax (R) Tube Drive na homogeneização de tecidos animais

<b>Tecido</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Referência</b>
Cérebro e fígado bovino	Extração de anfetamina, ibuprofeno e paracetamol e determinação por cromatografia	Lerch. O. e Sperling, S., 2010.
Fígado de peixe	Extração de compostos organofluorados e determinação por cromatografia	Aro et. al, 2021.
Cérebro e fígado humanos <i>post mortem</i>	Extração de benzodiazepinas e opióides com tampão fosfato	Bolte et al, 2021.
Cérebro e fígado humanos <i>post mortem</i>	Extração de benzodiazepínicos com tampão fosfato	Bolte et al, 2021.
Rim humano	Estudo toxicológico	Lehmann et al, 2018.

Fonte: (Autor)

### 2.2.2 Digestão assistida por micro-ondas

Uma vez definido o método de homogeneização das amostras, deve-se então digeri-las com o objetivo de solubilizar a matriz da amostra e os analitos. A escolha do procedimento de digestão deve ser feita considerando os reagentes, o tipo de digestão, tempo empregado e técnica usada na análise. A sequência analítica para determinação de elementos geralmente inclui uma série de etapas interconectadas tais como amostragem, preparo da amostra, calibração instrumental, determinação e processamento dos dados.

Nos dias atuais, uma variedade de elementos pode ser determinada rápida e simultaneamente usando técnicas instrumentais, entretanto a etapa de preparo das amostras permanece o principal desafio para a análise elementar (BIZZI et al, 2017). Essa etapa, também chamada de pré-tratamento da amostra, frequentemente envolve maior consumo de tempo em um procedimento analítico, especialmente quando se trata de amostras sólidas (CASTRO et al, 2009). Também é importante citar o risco de perda de analitos, contaminação das amostras e decomposição incompleta (ROCHA et al, 2013).

Pensando dessa forma, novas técnicas desenvolvidas devem ser mais fáceis, baratas e rápidas de modo a diminuir o tempo empregado, evitar contaminação e, conseqüentemente, atender alguns critérios da química verde (GONZALEZ et al, 2009). Outra preocupação que emerge no preparo de amostras é a geração de grandes quantidades de resíduos tóxicos oriundos dos procedimentos clássicos, os quais consomem grandes quantidades de ácidos para a decomposição das amostras. Conseqüentemente esses resíduos precisam ser tratados para evitar contaminação ambiental e isso demanda tempo e aumenta os custos da análise (GONZALEZ et al, 2009). Além do mais, o uso de reagentes concentrados é sempre perigoso e envolve diluição dos digeridos antes da etapa de determinação instrumental (BARBOSA et al, 2015; NÓBREGA et al, 2012). Nesse contexto, a química verde visa reduzir o impacto dos procedimentos químicos na saúde humana e meio ambiente, desse modo, muitos procedimentos analíticos que evitam o uso de ácidos concentrados podem ser implementados sem prejudicar o desempenho analítico, além de resultar em práticas mais seguras e com custos menores (ROCHA et al, 2013).

Ocasionalmente, o preparo de amostras sólidas para determinação de elementos traço pode ser feito apenas por diluição, entretanto, para a maior parte das

determinações, necessita-se decompor a matriz da amostra, o que pode ser feito por via seca ou úmida. Nessa última usualmente se empregam recipientes fechados e pressurizados para evitar contaminação e perdas por volatilização (CASTRO et al, 2009).

A digestão assistida por micro-ondas tem progressivamente se tornado um procedimento padrão para preparo de amostras para determinação de elementos traços, uma vez que se tornou, gradualmente, uma estratégia para implementação de procedimentos analíticos mais eficientes no que diz respeito a condições mais seguras de operação, controle de reações químicas em altas pressões e temperaturas, além de maior eficiência de decomposição da matriz da amostra (ROCHA et al, 2013; GARITTA et al, 2021). Essa técnica, associada ao uso de ácido nítrico, tem sido empregada para decomposição de matrizes biológicas em elevadas temperaturas e/ou pressões empregando mínimas quantidades de reagentes concentrados ou soluções ácidas bem diluídas para reduzir a acidez residual produzindo soluções mais compatíveis com a maioria dos sistemas de detecção (ROCHA et al, 2013; BARBOSA et al, 2015). O ácido nítrico é frequentemente usado no processo de decomposição de amostras por sua fácil manipulação, purificação e eficiência na oxidação de compostos orgânicos presentes em amostras biológicas (GONZALEZ et al, 2009; CASTRO et al, 2009).

A digestão de amostras usando ácidos diluídos tem se tornado uma tendência devido às vantagens apresentadas, tais como o consumo reduzido de ácido mantendo a alta eficiência de digestão e baixa acidez residual, os quais são parâmetros importantes no desenvolvimento de métodos mais verdes (BIZZI et al, 2017). A eficiência do ácido nítrico diluído na oxidação da matéria orgânica pode ser explicada pela regeneração do ácido promovida pela combinação de espécies de óxido de nitrogênio com o oxigênio – quando o ácido diluído promove a oxidação da matéria orgânica na amostra, forma-se NO que é facilmente oxidado a NO<sub>2</sub> e futuramente reage com água que resultando na regeneração do ácido nítrico (BIZZI et al, 2011, GARITTA et al, 2021). O peróxido de hidrogênio é comumente associado aos processos de digestão com ácido nítrico diluído por contribuir diretamente no processo de oxidação da matéria orgânica (ROCHA et al, 2013; BIZZI et al, 2017). Outro aspecto importante a ser considerado na escolha do tipo de ácido e sua concentração é a técnica instrumental a ser utilizada para determinação. Os reagentes usados podem ser considerados uma fonte de interferência e no ICPMS os efeitos são mais

pronunciados porque podem resultar em ionização tardia e formação de espécies poliatômicas (BIZZI et al, 2014).

Recentemente, alguns procedimentos usando a digestão assistida por micro-ondas e soluções de ácido nítrico diluído têm sido reportados. Gonzalez e colaboradores, testaram a eficiência de um método de digestão assistida por micro-ondas para digestão de amostras de grãos de soja, músculo e vísceras bovinos no qual empregaram soluções de ácido nítrico em diferentes concentrações (GONZALEZ et al, 2009). Nóbrega e colaboradores, empregaram o uso de soluções de ácido nítrico em diferentes concentrações, 14,0, 7,0, 4,0, 2,0 e 1,0 mol L<sup>-1</sup>, aliado ao uso de peróxido de hidrogênio concentrado em amostras de leite integral e fígado bovino e demonstraram eficiência no uso de soluções diluídas (NÓBREGA et al, 2012). Bizzi e colaboradores, 2014, usaram soluções diluídas de ácido nítrico associadas com peróxido de hidrogênio para determinação de elementos traço e essenciais em amostras de fígado bovino e leite em pó (BIZZI et al, 2014). Dentre as vantagens previamente discutidas, os autores relataram valores relativamente baixos de limites de detecção e desvios padrão relativo na determinação por ICP-MS resultante do uso de ácido nítrico diluído na digestão das amostras.

Considerando os aspectos abordados, os reagentes usados na digestão de mostras biológicas não devem introduzir interferentes na determinação por ICP-MS, as soluções obtidas devem ter baixo teor de carbono orgânico dissolvido e acidez residual e total de sólidos totais dissolvidos menor que 0,1 % mv<sup>-1</sup>. Portanto, soluções de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio são os reagentes mais apropriados para digestão de amostras contendo altas quantidades de matriz orgânica e uma das melhores opções para o preparo desse tipo de amostra é o uso da digestão assistida por micro-ondas (BIZZI et al, 2017).

### **2.2.3 Determinação via ICP-MS**

Atualmente, levando em consideração a instrumentação moderna usada para determinação elementar, ICPOES e ICP-MS são técnicas muito bem estabelecidas e comumente usadas para determinação de elementos em concentrações muito baixas. (MONTASTER, A., 1998). A espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado é uma das técnicas analíticas mais rápidas e sensíveis para determinação de 80 diferentes elementos incluindo metais pesados e elementos traço e ultra-traço

em diferentes matrizes de amostras (RAO, R. N.; TALLUTI, M. V.N. K, 2007; AL-HAKKANI, M. F., 2019).

Dentre as principais vantagens sobre outras técnicas espectrométricas, tais como Espectrometria de Absorção Atômica, AAS na sigla em inglês, e ICPOES, pode-se citar limites de detecção iguais ou menores que aqueles obtidos pelo forno de grafite, análise rápida, manipulação de matrizes simples e complexas com um mínimo de interferências de matriz devido às altas temperaturas do plasma, capacidade de detecção superior às observadas no ICPOES com as mesmas condições amostrais e habilidade de obtenção de informação isotópica (AL-HAKKANI, M. F., 2019).

Normalmente o plasma é produzido por meio da ionização do argônio à pressão atmosférica e sustentado por um campo energético de alta frequência (30 MHz) com uma potência entre 1000 e 2000 W. A temperatura do plasma pode variar entre 6000 e 10000 K, apropriado para excitação e ionização de espécies elementares. A tocha consiste em três tubos de quartzo concêntricos dentro dos quais fluxos diferentes de argônio são introduzidos. Quando a amostra é introduzida no plasma, por meio de nebulização pneumática, ela sofre dessolvatação, vaporização, atomização e ionização antes de entrar no analisador de massas. Os íons advindos do plasma são transferidos para o espectrômetro de massas por meio de cones de níquel que fazem uma interface entre uma região de pressão atmosférica para baixa pressão. Então os íons com carga positiva são separados de acordo com a razão massa carga do íon,  $m/z$ , analisados no quadrupolo, um analisador de massas mais frequentemente utilizado no mercado, e finalmente íons são detectados por uma fotomultiplicadora e o sinal é amplificado (MONTASTER, A., 1998).

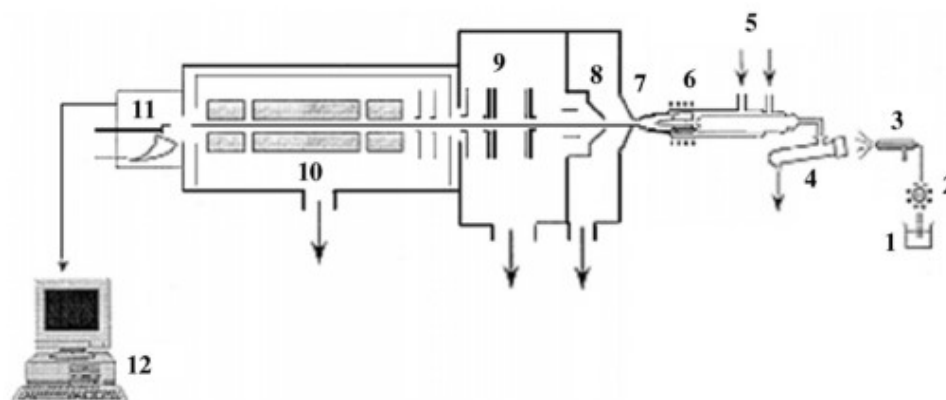


Figura 3 - Esquema representativo de um ICP-MS: (1) amostra em solução; (2) bomba peristáltica; (3) nebulizador; (4) câmara de spray; (5) entrada de Ar para o plasma e refrigeração; (6) bobinas de indução/ tocha; (7) cone de amostragem; (8) skimmer; (9) lentes focalizadoras; (10) analisador de massas tipo quadrupolo; (11) detector tipo multiplicador de elétrons; (12) coletor de dados.

(Fonte: Rao, R. N.; Talluti, M. V.N. K, 2007)

Muito recentemente, a gama de instrumentos ICP-MS baseados em quadrupolo foi ampliada com um novo tipo de instrumento, o espectrômetro de massas ICP-tandem MS/MS, que é muitas vezes referido como triplo quadrupolo ICP-MS/MS ou ICP-QQQ. A principal diferença quando comparado aos sistemas tradicionais é a introdução de um quadrupolo adicional ( $Q_1$ ) antes da cela de colisão e reação, o qual pode funcionar como um filtro de massas, desse modo, permitindo entrar apenas íons com uma razão massa carga  $m/z$  o que contribui para um controle melhor sobre reações que ocorrem na cela e compreensão sobre os mecanismos e origem dos íons formados nas reações. Para a determinação dos elementos que sofrem sobreposição espectral, a cela de colisão e reação pode ser pressurizada com um gás, reativo ou não reativo, e  $Q_1$  pode ser usado com um guia para os íons nos típicos sistemas ICPMS com cela de reação ou como um filtro de massas, no modo tandem MS/MS (BALCAEN et al., 2015).

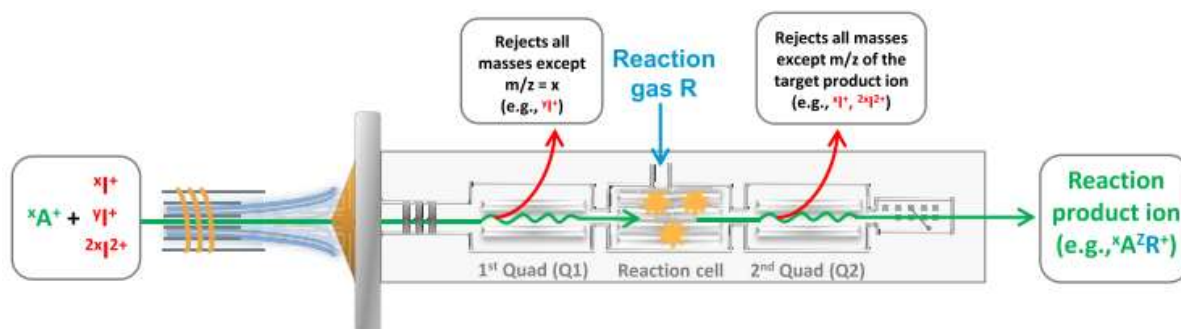


Figura 4 - Representação esquemática de operação do ICPMS-MS na determinação da espécie  ${}^x\text{A}^+$ .

(Fonte: Balcaen et al., 2015)

Depois da introdução do primeiro instrumento comercialmente disponível no mercado em 1983, a técnica tem sido melhorada constantemente e muitos fabricantes têm produzido instrumentos robustos e confiáveis com limites de detecção muito baixos e alta resolução espectral para detecção isotópica multi elementar. Essa técnica é rotineiramente empregada em diversos campos, dentre os quais se pode citar geoquímica, ambiental, ciências da saúde, indústria (alimentos, química, semicondutores e nuclear), ciência forense e arqueologia. (AMMANN, A. A., 2007).

Portanto, considerando a versatilidade dessa técnica instrumental, alguns autores a empregaram na determinação de elementos essenciais, metais pesados, traços e ultra-traços em amostras de alimentos e vísceras de animais. Na Tabela 3 estão resumidos alguns trabalhos nos quais foram empregados o uso do ICP-MS para determinação de metais e metaloides em amostras de diversas matrizes alimentícias.

Tabela 3 - Emprego do ICP-MS para determinações em matrizes alimentícias

(continua)

Tipo de amostra	Objetivo	Referência
Mel, carne de porco, atum, cereais matinais, iogurtes, sucos, peixe, carne bovina, cenoura.	Determinação de Li, B, Na, Mg, Al, K, Ca, Ti, V, Cr, Fe, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Ge, As, Se, Sr, Mo, Ag, Cd, Sn, Sb, Te, Ba, Hg, Pb e U e melhoria dos limites de quantificação de alguns elementos para análise de risco em amostras alimentícias infantis.	Chevallier et al, 2015
Nozes e outras sementes comestíveis	Li, Cr, Mn, Co, Cu, Zn, As, Se, Rb, Sr, Mo, Cd, Cs, Ba, Pb, Th e U	Yin et al, 2015
Filé de peixe	Determinação de As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Se e Zn em amostras de filé de peixes digeridas em MIC ( <i>microwave-induced combustion</i> ) com ácido nítrico diluído.	Maciel et al, 2014

Rins, fígado e músculo de ovelhas	Determinação de As, Cd, Pb, Hg, Co, Cr, Cu, Zn para obtenção de informações sobre a nutrição dos animais estudados.	Pereira et al, 2021
Rim e fígado bovino	Determinação de As, Cd, Pb, Cu, Se e Zn para avaliação da qualidade das vísceras para consumo humano.	Nriagu et al, 2009

Fonte: (Autor)

### 2.3 Requisitos Mínimos de Validação

Dados analíticos confiáveis são um pré-requisito para interpretação correta nos estudos científicos assim como na rotina diária de trabalho. Na pesquisa científica, resultados não confiáveis podem levar à super ou subestimação dos efeitos, falsas interpretações e conclusões injustificadas. Se os erros não são óbvios, eles podem permanecer indetectados durante um estudo ou investigação específicos. A menos que esses resultados sejam contestados por outros *experts* na área, eles podem ser replicados na comunidade científica ou se tornar parte do conhecimento em uma determinada área de pesquisa e causar futuras interpretações erradas (PETERS, F. T.; DRUMMER, O. H. e MUSSORF, F., 2007). Assim, o resultado de uma medição é sempre usado para subsidiar alguma tomada de decisão, seja ela a conformidade de um produto ou serviço a alguma especificação, ao requisito de alguma norma nacional ou internacional ou a obediência à alguma lei. Surge então a necessidade de validar um procedimento analítico (BRASIL, 2011).

A validação é um estudo experimental e documentado que objetiva demonstrar que o procedimento analítico avaliado é adequado à finalidade proposta, de forma a assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos (BRUCE, P., MINKKINEN, P. e RIEKKOLA, M.L., 1998). Os parâmetros e critérios de validação aplicáveis às determinações dos analitos devem levar em consideração o nível de interesse no qual alguma decisão será tomada. Os parâmetros a serem calculados durante o processo de validação de métodos para a determinação de contaminantes inorgânicos são linearidade, seletividade; efeito de matriz, limite de detecção, limite de quantificação, precisão (repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial), recuperação/veracidade e robustez (BRASIL, 2011).

### 2.3.1 Faixa de trabalho, linearidade e curva de calibração

A faixa de concentração de trabalho, ou faixa dinâmica linear, de um método desempenha um papel importante na validação do método. O intervalo de concentração deve ser escolhido de forma adequada ao nível de concentração dos elementos e deve-se tomar cuidado para não exceder esse intervalo estabelecido (D'ILIO et al, 2008).

O ICP-MS é uma técnica bem conhecida por se beneficiar de uma ampla faixa dinâmica linear, cerca de oito ordens de grandeza. Embora as diluições de amostra possam ser úteis, não é viável diluir cada amostra individualmente em razão da gama de concentrações encontradas nas diferentes matrizes de amostras –  $\text{mg kg}^{-1}$  até  $\text{ng kg}^{-1}$  (MILLOUR et al, 2011). A sensibilidade do procedimento analítico é principalmente determinada pelo gradiente, a inclinação da curva de calibração. Se a curva de calibração é uma reta, a sensibilidade é constante em toda a faixa de trabalho e é determinada, principalmente, pela inclinação,  $b$ , da reta de calibração.

A linearidade é a capacidade do método produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado, de forma mais simples, é a capacidade do procedimento analítico produzir curvas de calibração que podem ser adequadamente ajustadas pela equação de uma reta, portanto é necessário verificar até que ponto a faixa de concentração do analito coincide com a faixa dinâmica linear e finalmente a faixa de trabalho e a curva de calibração devem ser estabelecidas a partir das concentrações nas quais a linearidade é constatada (BRASIL, 2011).

A curva de calibração pode ser preparada de três maneiras distintas. Curva de Calibração do Analito em Solução (CCAS), construída a partir dos padrões de calibração do analito puro em solvente e utilizada apenas quando comprovada a inexistência de efeito de matriz. A CCMBF, Curva de Calibração da Matriz Branca Fortificada é construída a partir da matriz branca fortificada com os padrões de calibração do analito puro e a Curva de Calibração do Extrato da Matriz Branca Fortificado, CCEMBF, construída a partir do extrato da matriz branca fortificado. As curvas de calibração devem ser construídas de forma que haja no mínimo cinco níveis ( $I \geq 5$ ), distribuídos, preferencialmente de forma equidistante, cada nível de concentração deve ter sua solução preparada independentemente no mínimo três vezes ( $J \geq 3$ ), em que  $J$  é uma replicata independente. Cada solução da curva de

calibração deve ser lida aleatoriamente, inclusive soluções de mesma concentração, e em uma quantidade  $L$  de vezes tal que ao final o número de respostas instrumentais seja maior que trinta ( $N_y \geq 30$ ), em que  $N_y$  é o número total de leituras. O método dos mínimos quadrados ordinário (MMQO) poderá ser utilizado quando as respostas instrumentais forem homoscedásticas. Em caso de heterocedasticidade, o método dos mínimos quadrados ponderados poderá ser empregado para estimativa dos parâmetros de calibração – intercepto, inclinação e coeficiente de correlação, além dos desvio-padrão e covariância entre eles (BRASIL, 2011).

### 2.3.2 Seletividade e efeito de matriz

A especificidade e a seletividade estão relacionadas ao evento da detecção. Um método que produz resposta instrumental para apenas um analito é chamado específico, enquanto outro que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado seletivo (INMETRO, 2003).

A seletividade analítica está relacionada com a medida na qual o método pode ser usado para determinar analitos particulares em misturas ou matrizes sem interferências de outros componentes com comportamento semelhante. As interferências podem causar aumento ou diminuição da resposta instrumental. A magnitude do efeito normalmente é proporcional ao sinal, portanto chamado de efeito proporcional e algumas vezes de efeito rotacional, esse efeito pode mudar a inclinação da curva de calibração, mas não o intercepto. Um efeito transacional, ou efeito fixo, é consequente de um sinal produzido por interferências presentes em uma determinada solução e é independente da concentração do analito. Esse efeito é frequentemente referido como uma interferência de *background* e afeta o intercepto, mas não a inclinação da curva de calibração. Não é incomum que ambos os efeitos estejam presentes simultaneamente (EURACHEM, 2014).

A verificação da seletividade do procedimento analítico deve ser realizada a partir da comparação das respostas instrumentais advindas do processamento da matriz fortificada e do analito puro em solvente. Efeito de matriz é um estudo de seletividade que objetiva averiguar possíveis interferências causadas pelas diversas substâncias que compõem a matriz amostral, gerando, basicamente, fenômenos de diminuição ou ampliação da resposta instrumental (BRASIL, 2011). Vários testes e

suas estatísticas correspondentes podem ser utilizados para o estudo da seletividade dependendo da disponibilidade do analito, da matriz sem o analito e de amostras de referência nas concentrações de interesse. Se a matriz da amostra sem analito ou um grupo satisfatório de amostras de referência estão disponíveis, podem ser aplicados os testes  $F$  (*Snedecor*) de homogeneidade de variâncias e o teste  $t$  (*Student*) de comparação de médias, ou então realizada a análise dos desvios em relação aos valores de referência (INMETRO, 2003).

### 2.3.3 Limite de detecção e limite de quantificação

Quando medidas são feitas em baixas concentrações, há três conceitos a serem considerados. Primeiro, precisa-se estabelecer um valor de um resultado para determinado analito que seja significativamente diferente de zero. Nesse nível de concentração esse valor é chamado de “valor crítico”, “valor de decisão” ou  $CC\alpha$ . Segundo, é importante conhecer a menor concentração do analito que pode ser detectada por um método em um determinado nível de confiança. Nesse caso, são usados termos como limite de detecção (LD), valor mínimo detectável ou  $CC\beta$ . Finalmente, é importante estabelecer a menor concentração na qual a performance é aceitável para uma determinada aplicação, tal valor é definido como limite de quantificação, LQ. A terminologia relacionada a todos esses conceitos é muito diversa. Em procedimentos de validação, LD e LQ, são os parâmetros mais comumente determinados (EURACHEM, 2014).

### 2.3.4 Precisão

A precisão de um método é a estimativa da dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. As três maneiras de expressá-la são por meio da repetitividade e da precisão intermediária (ou reprodutibilidade interna ou reprodutibilidade intralaboratorial) (EURACHEM, 2014).

A repetitividade é a precisão intracorrída, ou seja, é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas, efetuadas sob as mesmas condições de

medição. Para avaliá-la deve-se proceder à preparação e análise de MRC's ou amostras de matrizes brancas fortificadas com os analitos e calcular a concentração determinada para cada amostra, as concentrações médias, os desvios-padrão e coeficientes de variação de repetitividade em cada nível de concentração. A precisão intermediária refere-se à precisão intermediária avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, mesmo laboratório, mas alterando algumas condições, tais como dias de análise, analistas, equipamentos e condições ambientais. Assim o estudo da precisão intermediária constitui-se essencialmente em reproduzir os estudos de repetitividade em diferentes condições experimentais dentro de um laboratório (BRASIL, 2011)

Em condições de repetitividade, o coeficiente de variação deve tipicamente situar-se abaixo de dois terços dos valores apresentados na Tabela 1 conforme a faixa de concentração. No caso de análises repetidas de uma amostra em condições de precisão intermediária, o coeficiente de variação intralaboratorial da média não deve exceder aos valores da Tabela 4.

Tabela 4 - Critérios de aceitação da reprodutibilidade

Concentração (c)	Coeficiente de variação (CV)
	%
$c < 1 \mu\text{g kg}^{-1}$	35
$1 \mu\text{g kg}^{-1} \leq c < 10 \mu\text{g kg}^{-1}$	30
$10 \mu\text{g kg}^{-1} \leq c < 100 \mu\text{g kg}^{-1}$	20
$100 \mu\text{g kg}^{-1} \leq c < 1 \text{mg kg}^{-1}$	15
$1 \text{mg kg}^{-1} \leq c < 10 \text{mg kg}^{-1}$	10
$10 \text{mg kg}^{-1} \leq c < 100 \text{mg kg}^{-1}$	7,3
$100 \text{mg kg}^{-1} \leq c < 1 \text{g kg}^{-1}$	5,3
$1 \text{g kg}^{-1} \leq c < 10 \text{g kg}^{-1}$	3,7
$10 \text{g kg}^{-1} \leq c < 100 \text{g kg}^{-1}$	2,7
$100 \text{g kg}^{-1} \leq c < 1\text{kg kg}^{-1}$	2,0

(Fonte: BRASIL, 2011)

### 2.3.5 Veracidade e recuperação

A veracidade pode ser definida como o grau de concordância entre a média de um número infinito de valores medidos repetidos e um valor de referência. Em outras

palavras, é a concordância entre a média de um número suficientemente grande de resultados de um ensaio e o valor de referência aceito convencionalmente como verdadeiro. A veracidade está inversamente relacionada ao erro sistemático ou à correção ou ao fator de correção (BRASIL, 2011).

A determinação da veracidade deve ser feita por intermédio de ensaios de recuperação utilizando-se material de referência certificado – MRC. Caso não haja MRC disponível, a determinação da recuperação deve ser feita por intermédio de matriz branca fortificada. Na falta de uma matriz branca pode-se usar uma amostra de ensaio com baixa concentração do analito. Não se deve confundir a recuperação com a eficiência de extração ou de digestão da amostra. A recuperação mede a tendência total do procedimento analítico sendo uma expressão de sua veracidade e tem por objetivo corrigir o resultado da análise dos erros sistemáticos oriundos dos efeitos de extração ou digestão e das perdas advindas de todas as etapas da marcha analítica, realizadas até a leitura da resposta instrumental (BRASIL, 2011; EURACHEM, 2014).

### **2.3.6 Robustez**

A robustez de um método de ensaio mede a sensibilidade que este apresenta face a pequenas alterações. Quanto maior for a robustez de um método, mais reprodutíveis serão os resultados obtidos pelo referido método e maior a confiança desse método quanto à sua precisão. Uma forma de avaliar a robustez de um método é por meio do teste de Youden, com o qual também pode-se ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados, indicando qual o tipo de influência de cada uma (INMETRO, 2003).

Dentre os fatores podem afetar o resultado analítico podem ser citados as condições de armazenamento, condições ambientais e/ou de preparação da amostra, origem e estabilidade dos reagentes, composição da amostra, tamanho (massa ou volume) da amostra, as condições de pH, temperatura, tempo, composição da mistura de solventes ou reagentes para a abertura/extração/digestão/limpeza da amostra e configurações do instrumento de medição. As etapas do estudo de robustez consistem na identificação dos possíveis fatores que possam influenciar os resultados; variação dos fatores em pelo menos dois níveis; realização dos experimentos pela abordagem clássica, na qual um fator é avaliado por vez, ou pela abordagem do planejamento fatorial completo ou fracionário; identificação dos fatores mais significativos sobre o

resultado da medição analítica e estudo detalhado sobre eles de forma que não comprometam a veracidade e a precisão do método e finalmente, explicitação dos fatores que afetam o procedimento de análise ressaltando-se os cuidados especiais com esses fatores. Caso seja verificado que não há influência, ou há fraca influência, de pequenas variações dos fatores estudados o procedimento analítico é classificado como robusto e adequado para as análises de rotina. Em caso de verificação de forte influência dos fatores estudados, o procedimento pode ser considerado como não robusto e inadequado para as análises de rotina; procedimento analítico de uso restrito, ou procedimento analítico não robusto e inadequado para as análises de rotina na faixa de variação estudada dos fatores de influência (BRASIL, 2011).

### **2.3.7 Expansão de escopo**

Para a inclusão de novas matrizes em procedimentos analíticos validados devem ser avaliados, no mínimo, os parâmetros de seletividade/efeito de matriz, veracidade/recuperação e repetitividade para comprovar que a inclusão da nova matriz não altera o desempenho do método. As novas matrizes podem ser representadas por tecidos diferentes de uma mesma espécie (e.g., fígado e rim bovino); o mesmo tecido de espécies diferentes (e.g., rim bovino, rim suíno), ou até tecidos diferentes de espécies diferentes (e.g., fígado de peixe e rim bovino) (BRASIL, 2011).

As curvas de calibração envolvidas nesses estudos devem contemplar uma faixa de calibração que inclua os níveis de interesse de ambas as matrizes. Para a inclusão da nova matriz, o estudo comparativo do efeito de matriz entre as duas curvas de calibração envolvendo a nova matriz e a velha matriz é semelhante ao estudo realizado na seletividade e efeito de matriz. Após a realização das duas curvas de calibração, aplica-se o teste  $t$  de Student para verificar a igualdade estatística dos interceptos  $a_1$  e  $a_2$  e das inclinações  $b_1$  e  $b_2$  das curvas de calibração com a velha e a nova matriz. Tendo sido aprovada a inclusão da nova matriz ou dos novos analitos através da comparação de suas curvas de calibração, procede-se então aos estudos da veracidade e da precisão para cada analito na nova e na velha matriz. Se a veracidade e a precisão dos analitos na nova matriz forem iguais ao da velha matriz, então a análise de rotina dos analitos na nova matriz poderá ser feita com a curva de calibração da velha matriz (BRASIL, 2011).

### **3 OBJETIVO**

Este trabalho tem como objetivo principal desenvolver e validar uma metodologia para a análise de metais e metaloides em amostras de tecidos animais via digestão assistida por micro-ondas e determinação por ICP-MS.

#### **3.1 Objetivos específicos**

De modo a alcançar o objetivo geral, o presente trabalho tem os seguintes objetivos específicos:

- 3.1.1** Otimizar o processo de moagem de fígado bovino no moedor IKA Ultra Turrax® Tube Drive
- 3.1.2** Otimizar os parâmetros de digestão por micro-ondas da amostra de fígado bovino no digestor por micro-ondas CEM-MARS 6 One Touch, incluindo o emprego de solução ácida diluída.
- 3.1.3** Empregar os requisitos mínimos de validação previstos no Manual da Garantia Analítica do MAPA, a saber, linearidade, seletividade, efeito de matriz, limite de detecção e quantificação, precisão, recuperação e robustez.
- 3.1.4** Avaliar os resultados obtidos na validação.
- 3.1.5** Realizar experimentos para expansão de escopo do método analítico validado para as seguintes matrizes: fígado suíno, de galinha e de peixe, rim bovino e suíno, musculatura de peixe e sangue bovino.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Instrumentação e materiais

Espectrômetro de massas triplo quadrupolo acoplado a plasma induzido (ICP-MS/MS) - Agilent 8900 ICP-QQQ.

Amostrador automático Agilent SPS4.

ULTRA-TURRAX® Tube Drive equipado com tubos BMT-20 e esferas de borossilicato.

Micro-ondas CEM MARS 6 iWave One Touch.

Rotor MARSXpress e tubos PFA de 20 mL.

Balanças analíticas Mettler-Toledo ME204/A e Shimadzu AUY220.

Micropipetas de 10-100 µL; 20-200 µL e 100-1000 µL.

Repipetador automático Eppendorf.

Destilador de ácidos Milestone Duopur Quartz.

Purificador de água Elga Veolia Purelab Flex 3.

Centrífuga Hettich Universal 320.

### 4.2 Reagentes e soluções

Água 18,2 MΩ.cm.

Ácido nítrico EMSURE® ISO Merck 65 % v v<sup>-1</sup>.

Peróxido de hidrogênio EMSURE® ISO Merck 30 % v v<sup>-1</sup>.

Soluções padrão monoelementar Sigma Aldrich 1000 mg L<sup>-1</sup> de arsênio, níquel, chumbo e cádmio.

Solução padrão monoelementar Merck 1000 mg L<sup>-1</sup> de vanádio.

Solução padrão monoelementar SPEXertificate® 1000 mg L<sup>-1</sup> de gálio.

Soluções padrão monoelementar Inorganic Ventures 1000 mg L<sup>-1</sup> de zinco, ferro, cobalto, cobre, cromo, bário, alumínio, índio, germânio, escândio, bismuto, mercúrio, antimônio, molibdênio e urânio.

Solução padrão multielementar 50 mg L<sup>-1</sup> de terras raras contendo cério, disprósio, érbio, európio, gadolínio, hólmio, lantânio, lutécio, neodímio, praseodímio, samário, escândio, térbio, túlio e itérbio.

## 4.3 Procedimentos experimentais

### 4.3.1 Otimização da moagem

Para realizar a moagem das amostras foi utilizado o moedor IKA Ultra Turrax® Tube Drive. Inicialmente foram feitos testes de moagem com o tubo DT-20 e amostras de fígado suíno (FS), fígado de galinha (FG) e fígado bovino (FB) adquiridas no mercado local. As amostras foram previamente cortadas com auxílio de uma faca de zircônia e alíquotas menores foram separadas e armazenadas em potes de plástico a temperatura de -5 °C. Os parâmetros estudados foram massa de amostra, massa de água e tempo de moagem.

O tubo DT-20 foi o primeiro a ser utilizado nos experimentos por ser o tubo indicado pelo fabricante para amostras de tecidos animais. Inicialmente foi utilizada uma amostra de fígado suíno para estudar os parâmetros massa de amostra, massa de água e tempo de moagem. As melhores condições obtidas nesses parâmetros foram replicadas em uma amostra de fígado bovino.

Em seguida, os parâmetros massa de amostra, massa de água e tempo de processamento foram estudados utilizando o tubo BMT-20 com uma amostra de fígado bovino e todos os testes neste modelo de tubo foram realizados com adição de 10 esferas de borossilicato e rotação de 4000 rpm.

Um novo conjunto de testes foi feito no tubo BMT-20 substituindo-se a massa de água por soluções de ácido nítrico em diferentes concentrações. Foram adicionados 2 g de ácido nítrico 22 % v v<sup>-1</sup> em uma alíquota de 4 g de amostra de fígado bovino e 2 g de ácido nítrico 50 % v v<sup>-1</sup> em outra alíquota de 4 g de amostra de fígado. As duas alíquotas foram processadas a 4000 rpm por 10 min.

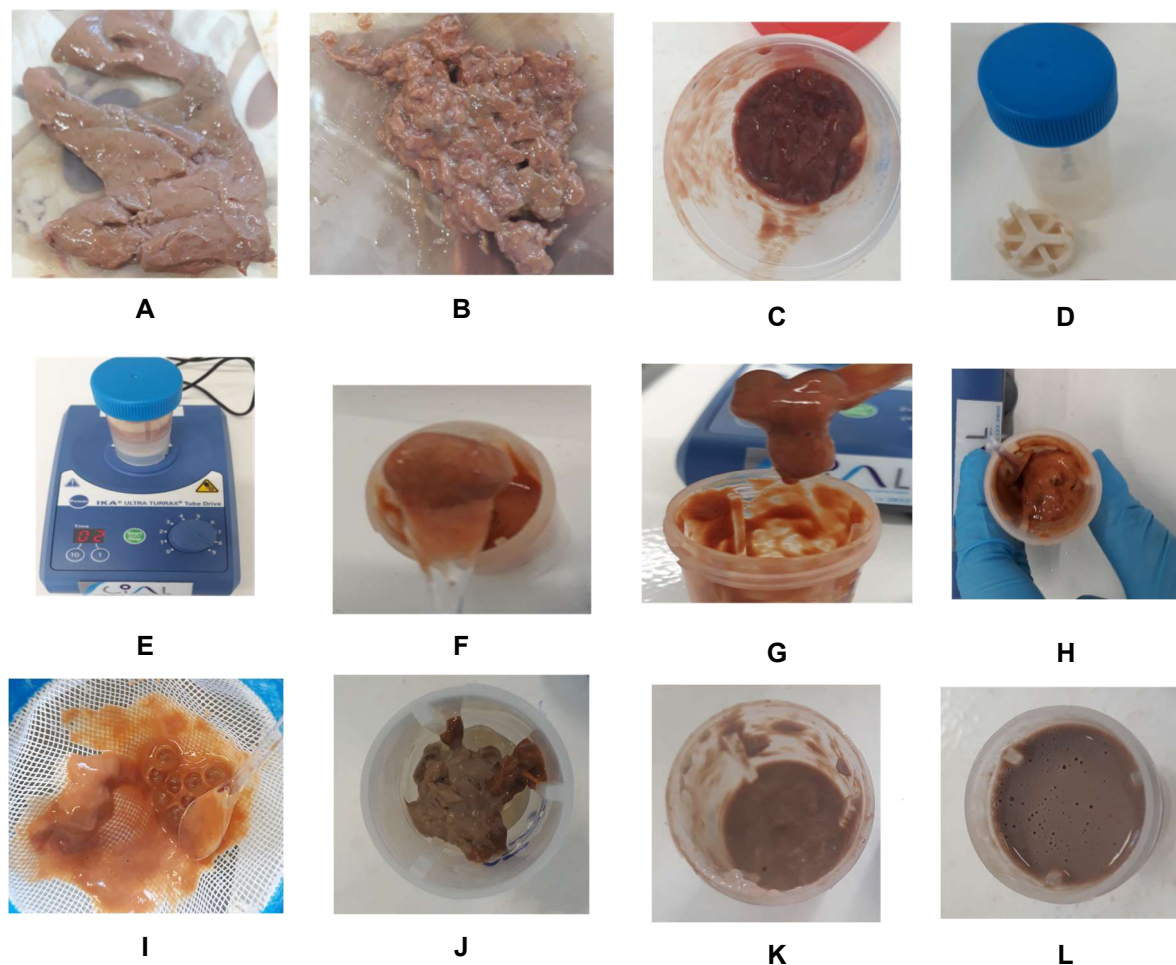


Figura 5 - Desenvolvimento da moagem de fígado bovino Ultra Turrax. (A) amostra de fígado bovino in natura; (B) e (C): amostra de fígado cortada com faca; (D): tubo DT-20; (E): processamento Ultra-Turrax; (F): amostra processada no tubo DT-20 (teste 11); (G), (H) e (I): amostra de fígado bovino processada no tubo BMT-20; (J) e (K): amostra de fígado bovino processada em meio ácido nítrico 22% v v-1 no tubo BMT-20; L: amostra de fígado de galinha processada em meio ácido nítrico 22% v v-1 no tubo BMT-20.

(Fonte: Autor)

#### 4.3.2 Teste da eficiência de moagem

Depois de definidos os parâmetros da moagem, cinco alíquotas independentes da amostra de fígado bovino foram processadas no Ultra Turrax® após adição de alíquotas de padrões de gálio, índio e irídio. Esses elementos foram utilizados pois sua ocorrência natural nessa matriz amostral é improvável.

Em uma alíquota de 4 g da amostra de fígado bovino foram adicionados 2 g de solução de ácido nítrico 22% v v<sup>-1</sup>. Essa amostra foi processada no UltraTurrax Tube Drive® no tubo BMT-20 com adição de 10 esferas de borossilicato por 10 min a 4000 rpm. Foram pesadas cinco alíquotas de 200 mg da mistura obtida em tubos PFA de

20 mL, aos quais foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio 30 % v v<sup>-1</sup>, 1500  $\mu\text{L}$  de água 18,2 M $\Omega$ .cm e 1500  $\mu\text{L}$  de ácido nítrico 65 % v v<sup>-1</sup> destilado.

Em uma segunda alíquota de 4 g da amostra de fígado bovino foram adicionados 2 g de solução de ácido nítrico 22% v v<sup>-1</sup> fortificada com padrões de gálio, índio e irídio de forma que a concentração final, após a etapa de digestão e aferição do volume, ficasse igual a 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  de gálio e 5  $\mu\text{g L}^{-1}$  de índio e irídio. A alíquota foi processada no UltraTurrax Tube Drive® usando o tubo BMT-20 com adição de 10 esferas de borossilicato por 10 min a 4000 rpm.

Foram pesadas cinco alíquotas de 200 mg da mistura obtida em tubos PFA de 20 mL aos quais foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio 30 % v v<sup>-1</sup>, 1500  $\mu\text{L}$  de água 18,2 M $\Omega$ .cm e 1500  $\mu\text{L}$  de ácido nítrico destilado 65 % v v<sup>-1</sup>. Logo em seguida, essas alíquotas foram pré-digeridas a frio por 15 min e então foram digeridas em micro-ondas sob as seguintes condições: potência máxima 800 W, rampa de aquecimento 20 min até 180°C seguido de 20 min de digestão a 180°C e 15 min de resfriamento. Após completo resfriamento (30 °C) as amostras foram transferidas para tubos Corning®, o volume final foi aferido até 15 mL com água 18,2 M $\Omega$ .cm e as soluções resultantes homogeneizadas e armazenadas em geladeira (4 °C) até a leitura no ICP-MS/MS para avaliação dos sinais analíticos dos isótopos <sup>71</sup>Ga, <sup>115</sup>In e <sup>193</sup>Ir seguindo o cálculo da média, desvio-padrão e RSD. Por fim, considerou-se como parâmetro para uma homogeneização aceitável, um RSD menor que 5%. A Figura 6 a seguir ilustra as etapas do procedimento:

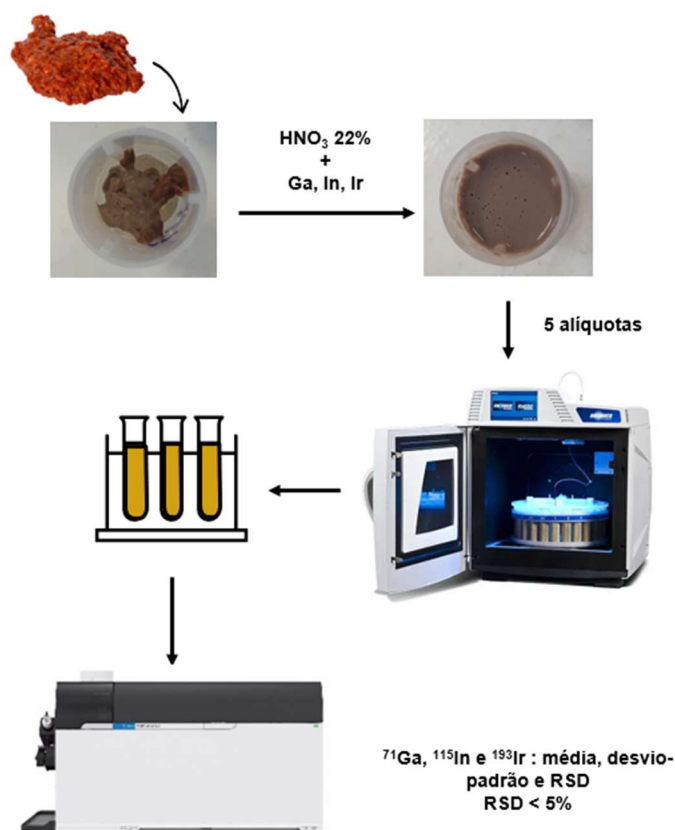


Figura 6 - Representação esquemática das etapas do teste de eficiência de moagem.  
(Fonte: Autor)

#### 4.3.3 Otimização da digestão

Em uma alíquota de 4 g da amostra de fígado bovino foram adicionados 2 g de solução de ácido nítrico 22% v v<sup>-1</sup> fortificada com padrões de gálio, índio e irídio de forma que a concentração final, após a etapa de digestão e avolumação (15 mL) fosse igual a 42 µg L<sup>-1</sup> de gálio e 4,2 µg L<sup>-1</sup> de índio e irídio. Foram adicionados 30 µL de uma solução multielementar de 50 mg L<sup>-1</sup> de Al, As, Ba, Cd, V, Cr, Hg, U, Ni, Pb, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Sm, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu, Co e Mo de forma que a concentração final do conjunto de amostras fortificadas, após a etapa de digestão e aferição do volume, fosse igual a 4,2 µg L<sup>-1</sup>. Essa alíquota foi definida como amostra fortificada.

Em uma segunda alíquota de 4 g da amostra de fígado bovino foram adicionados 2 g de solução de ácido nítrico 22% v v<sup>-1</sup> e padrões de Ga, In e Ir de forma que a concentração final, após a etapa de digestão e aferição do volume, ficasse igual a 42 µg L<sup>-1</sup> de Ga e 4,2 µg L<sup>-1</sup> de In e Ir. Essa alíquota, fortificada apenas com Ga, In

e Ir, foi definida como amostra branca. O conjunto de amostras branca e fortificada foi processado no UltraTurrax Tube Drive® no tubo BMT-20 com adição de 10 esferas de borossilicato por 10 min a 4000 rpm. As amostras fortificadas e não fortificadas foram pesadas em quadruplicata variando as quantidades de ácido nítrico destilado 65 % v v<sup>-1</sup>, peróxido de hidrogênio 30 % v v<sup>-1</sup> e água 18,2 MΩ.cm de acordo com a Tabela 5 abaixo:

Tabela 5 - Esquema de adição de reagentes

Amostras	Reagentes (mL)	Conc. final de HNO <sub>3</sub> : H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (% vv <sup>-1</sup> )
	HNO <sub>3</sub> : H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : H <sub>2</sub> O	
Amostra Fortificada 1 a 4	0,6: 0,2: 2,2	4: 1,3
Amostra Fortificada 5 a 8	0,9: 0,3: 1,8	6: 2,0
Amostra Fortificada 9 a 12	1,2: 0,4: 1,4	8: 2,6
Amostra Branca 1 a 4	1,2: 0,4: 1,4	8: 2,6
Branco analítico 1 a 4	1,2: 0,4: 1,4	8: 2,6

Fonte: (Autor)

Após adição dos reagentes, as alíquotas foram pré-digeridas a frio por 15 min e então foram digeridas em micro-ondas sob as seguintes condições: potência máxima 800 W, rampa de aquecimento 20 min até 180°C seguido de 20 min de digestão a 180°C e 15 min de resfriamento. Após completo resfriamento (30 °C) as amostras foram transferidas para tubos Corning®, o volume final foi aferido até 15 mL com água 18,2 MΩ.cm e as soluções resultantes homogeneizadas e armazenadas em geladeira (4 °C) até a leitura no ICP-MS/MS para determinação de <sup>27</sup>Al, <sup>51</sup>V, <sup>52</sup>Cr, <sup>59</sup>Co, <sup>60</sup>Ni, <sup>75</sup>As, <sup>95</sup>Mo, <sup>114</sup>Cd, <sup>121</sup>Sb, <sup>138</sup>Ba, <sup>139</sup>La, <sup>140</sup>Ce, <sup>141</sup>Pr, <sup>146</sup>Nd, <sup>147</sup>Sm, <sup>153</sup>Eu, <sup>159</sup>Tb, <sup>160</sup>Gd, <sup>163</sup>Dy, <sup>165</sup>Ho, <sup>166</sup>Er, <sup>169</sup>Tm, <sup>172</sup>Yb, <sup>175</sup>Lu, <sup>201</sup>Hg, <sup>206</sup>Pb e <sup>238</sup>U. A Figura 7 ilustra as principais etapas envolvidas na otimização da digestão.

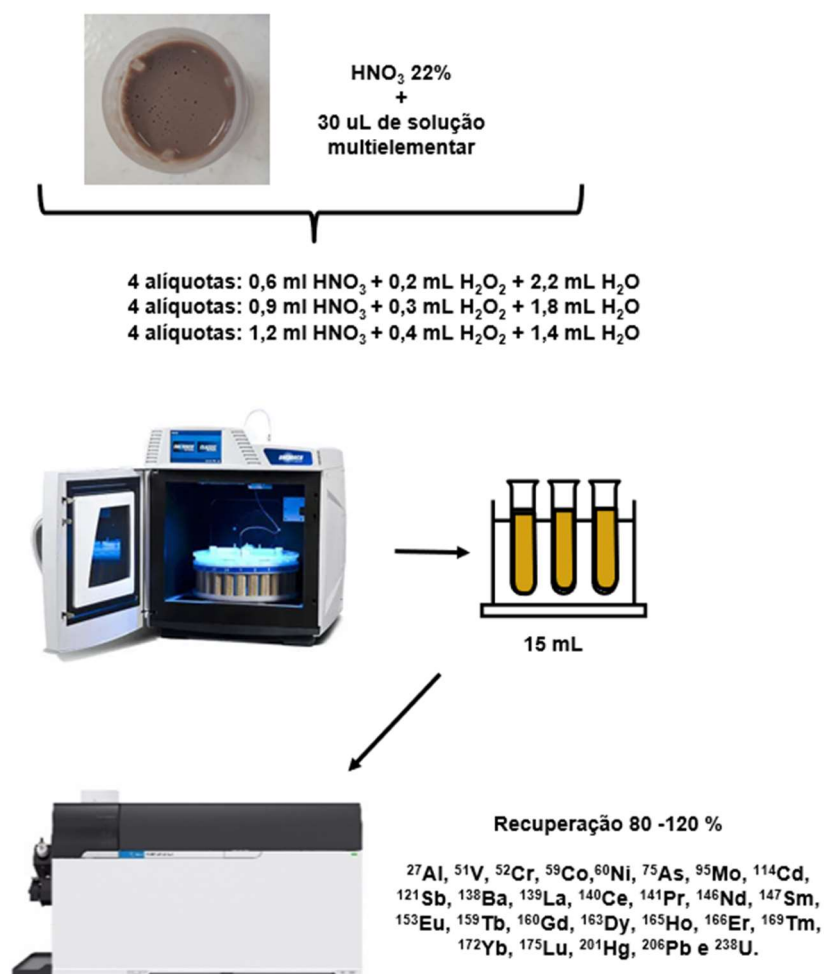


Figura 7 - Representação esquemática das etapas da otimização da digestão.  
(Fonte: Autor)

As amostras obtidas nesse teste foram analisadas no ICPOES para determinação de carbono orgânico total. Uma solução padrão de ácido oxálico de 10.000 mg L<sup>-1</sup> foi preparada a partir da dissolução de 5,2638 g do reagente monohidratado em 100 mL de água 18,2 MΩ.cm. Em seguida, foram preparadas soluções para a curva analítica com as concentrações de 0; 50; 100; 200; 500; 1000; 5000 e 8000 mg L<sup>-1</sup>. O carbono foi analisado no ICPOES na vista axial e comprimento de onda 175,22 nm.

#### 4.3.4 Estudos de Validação

A validação do método para determinação de metais e metalóides em amostras de fígado bovino, bem como a expansão de escopo do método para análise de outros

tecidos animais, foi feita conforme descrito no Manual da Garantia da Qualidade Analítica (BRASIL, 2011), exceto quando citado neste trabalho.

A amostra de fígado bovino adquirida no mercado local foi definida como amostra branca para os parâmetros de seletividade, efeito de matriz, limite de detecção e quantificação, precisão, recuperação e robustez.

Com o objetivo de melhorar a rotina analítica e minimizar erros e contaminação, uma solução de ácido nítrico 22 %  $v\text{-}v^{-1}$  foi preparada para substituir os volumes separados de adição de água e ácido nítrico 65 %  $v\text{-}v^{-1}$ . Um volume de 2,8 mL dessa solução tem a quantidade equivalente de ácido nítrico e água definidos no resultado do estudo da etapa de otimização da digestão.

Exceto quando mencionado, todas as alíquotas de fígado bovino para estudo dos parâmetros da validação foram preparadas a partir da adição de 2 g de ácido nítrico 22%  $v\text{-}v^{-1}$  em 4 g da amostra e posterior moagem no Ultra Turrax Tube Drive® utilizando 10 esferas de borossilicato a uma rotação de 4000 rpm por 10 minutos. A digestão de alíquotas de 200 mg de todas as amostras moídas foi feita no micro-ondas sob as mesmas condições, potência 800 W, aquecimento 20 minutos até 180 °C, digestão 20 minutos a 180 °C e tempo de resfriamento de 15 minutos, às quais previamente adicionados 200  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio 30 %  $v\text{-}v^{-1}$  e 2,8 mL de solução de ácido nítrico 22%  $v\text{-}v^{-1}$ . Depois de preparadas as amostras foram centrifugadas por 10 min a uma rotação de 5000 rpm em uma centrífuga Hettich Universal 320.

#### **4.3.4.1 Determinação da faixa de trabalho**

A faixa de trabalho foi determinada a partir da análise de uma amostra de fígado bovino adquirida no mercado local. Essa amostra foi quarteada e moída no Ultra Turrax Tube Drive® e cinco alíquotas foram digeridas no micro-ondas.

Após completa digestão e resfriamento, cada replicata do digerido foi transferido para um tubo Corning® de 15 mL, aos quais foram adicionados 120  $\mu\text{L}$  de solução padrão interno – 250  $\mu\text{g L}^{-1}$  de In, Ir e Bi; 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  de Ge e 2000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de Rh e 120  $\mu\text{L}$  de solução padrão interno 2000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de Sc e 5000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de Ga. Finalmente a solução foi aferida com água 18,2  $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$  até 12 mL, homogeneizada e centrifugada.

Uma curva analítica exploratória foi preparada em meio de ácido nítrico 5% nas seguintes faixas de concentração para todos os analitos: P0; 0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , P1; 0,2  $\mu\text{g L}^{-1}$ , P2; 0,5  $\mu\text{g L}^{-1}$ , P3; 1,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , P4; 2,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , P5; 4,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , P6; 8,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , P7; 16  $\mu\text{g L}^{-1}$ , P8; 24  $\mu\text{g L}^{-1}$  e P9; 32  $\mu\text{g L}^{-1}$  e cada solução padrão foi fortificada por meio da adição de 50  $\mu\text{L}$  de uma solução contendo gálio, índio e irídio. As amostras foram diluídas 50 vezes para análise de ferro, cobre e zinco. As amostras e a curva foram analisadas no ICP-MS/MS nas condições experimentais detalhadas na Tabela 6 e determinada a concentração dos analitos na amostra de fígado bovino. A Figura 8 representa o esquema que contempla as etapas realizadas no experimento de determinação da faixa de trabalho.

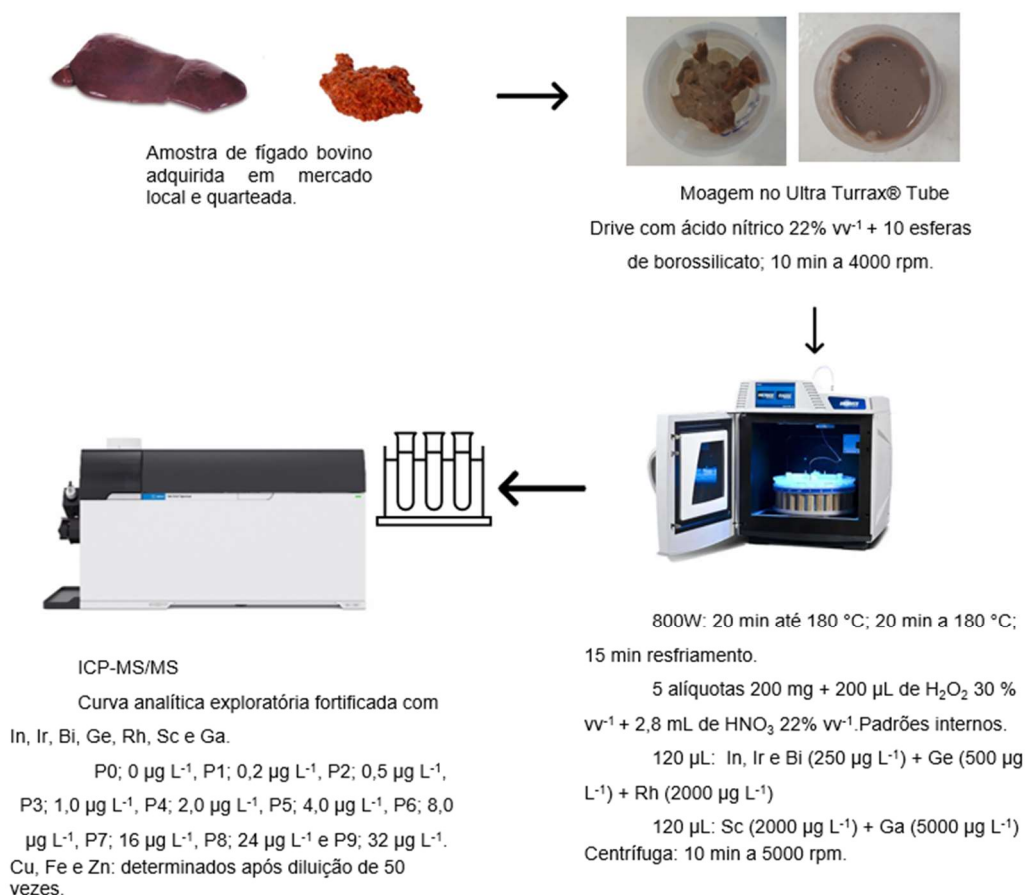


Figura 8 - Representação esquemática das etapas de determinação da faixa de trabalho.  
(Fonte: Autor)

Todos os analitos foram analisados no modo colisão com o gás hélio. A partir dessas informações a faixa de trabalho foi determinada. A faixa escolhida para os elementos vanádio, cromo, cobalto, arsênio, cádmio, antimônio, bário, mercúrio,

chumbo, urânio, lantânio, cério, praseodímio, neodímio, samário, európio, térbio, gadolínio, disprósio, hólmio, érbio, túlio, itérbio e lutécio foi 0,5 µg L<sup>-1</sup>; 1,5 µg L<sup>-1</sup>; 2,5 µg L<sup>-1</sup>; 3,5 µg L<sup>-1</sup> e 4,5 µg L<sup>-1</sup>. Para os elementos alumínio, manganês e cobre a faixa determinada foi 10 µg L<sup>-1</sup>; 30 µg L<sup>-1</sup>; 50 µg L<sup>-1</sup>; 70 µg L<sup>-1</sup> e 90 µg L<sup>-1</sup> e para os elementos molibdênio, ferro e zinco 3 µg L<sup>-1</sup>; 9 µg L<sup>-1</sup>; 15 µg L<sup>-1</sup>; 21 µg L<sup>-1</sup> e 27 µg L<sup>-1</sup>.

Tabela 6 - Condições experimentais de operação do ICP-MS/MS

<b>Condições experimentais ICP-MS/MS Agilent 8900 ICP-QQQ</b>	
Potência (W)	1550
Vazão gás de nebulização (L min <sup>-1</sup> )	1,07
Vazão do Plasma (L min <sup>-1</sup> )	15,0
Vazão do gás auxiliar (L min <sup>-1</sup> )	0,90
Rotação da pomba peristáltica (rps)	0,10
Vazão hélio (mL min <sup>-1</sup> )	5
<i>Sample uptake</i> (s)	48
<b>Padrões Internos</b>	<b>Analitos</b>
<sup>45</sup> Sc	<sup>56</sup> Fe, <sup>63</sup> Cu
<sup>69</sup> Ga	<sup>66</sup> Zn
<sup>72</sup> Ge	<sup>51</sup> V, <sup>52</sup> Cr
<sup>103</sup> Rh	<sup>95</sup> Mo
<sup>115</sup> In	<sup>27</sup> Al, <sup>55</sup> Mn, <sup>59</sup> Co, <sup>60</sup> Ni, <sup>75</sup> As, <sup>114</sup> Cd, <sup>121</sup> Sb, <sup>138</sup> Ba
<sup>193</sup> Ir	<sup>139</sup> La, <sup>140</sup> Ce, <sup>141</sup> Pr, <sup>146</sup> Nd, <sup>147</sup> Sm, <sup>153</sup> Eu, <sup>159</sup> Tb, <sup>160</sup> Gd, <sup>163</sup> Dy, <sup>165</sup> Ho, <sup>166</sup> Er, <sup>169</sup> Tm, <sup>172</sup> Yb, <sup>175</sup> Lu
<sup>209</sup> Bi	<sup>201</sup> Hg, <sup>206</sup> Pb, <sup>238</sup> U

Fonte: (Autor)

#### 4.3.4.2 Linearidade

Depois de determinadas as faixas de trabalho para cada um dos analitos, foram preparadas três replicatas independentes e a leitura, em duplicata, inclusive das soluções de mesma concentração, foi feita em ordem aleatória. Entre cada leitura foi utilizada uma solução de HNO<sub>3</sub> 5% v v<sup>-1</sup> para limpeza do sistema de introdução de amostras como cuidado para evitar contaminação cruzada.

Com os dados obtidos, prosseguiu-se o cálculo para definição da equação de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ponderados relativo, MMQPR. A estimativa da interseção,  $a_w$ , e inclinação,  $b_w$ , foram determinados para cada um dos analitos de acordo com a equação 1.

$$\hat{y}_i = a_w + b_w x_i \quad (1)$$

onde:

$\hat{y}_i$  = variável independente; resposta instrumental estimada pela equação de regressão do MMQPR.

$a_w$  = estimativa da interseção a

$b_w$  = estimativa da inclinação b

$x_i$  = variável independente; concentrações conhecidas do analito nas soluções padrão de calibração em cada nível de concentração

$$b_w = \frac{S_{xyw}}{S_{xxw}} = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i \bar{y}_{ij} - \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i - \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \bar{y}_{ij}}{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i^2 - (\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i)^2} \quad (2)$$

Em que:

$$S_{xyw} = \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i (x_i - x_w) (\bar{y}_{ij} - \bar{y}_w) \quad (3)$$

$$S_{xxw} = \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i (x_i - x_w)^2 \quad (4)$$

$$w_i = \frac{K \text{ norm}}{S_{y_i^2}} \quad (5)$$

$$K \text{ norm} = (S_{y_i^2})_{\text{médio}} \quad (6)$$

Substituindo (5) em (6) temos:

$$w_i = \frac{S_{y_i^2}}{s_{y_i^2}} \quad (7)$$

onde:

$\bar{Y}_{ij}$  = respostas instrumentais médias de cada nível

$w_i$  = peso para a resposta instrumental de um dado nível

$K_{\text{norm}}$  = constante de normalização para o MMQPR; média das variâncias das respostas instrumentais dos I níveis de concentração da curva de calibração.

$S_{y_i^2}$  = média das variâncias de todos os níveis I

$s_{y_i^2}$  = variância do nível I

$$a_w = \bar{y}_w - b_w x_w = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i^2 \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \bar{y}_{ij} - \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i - \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i \bar{y}_{ij}}{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i^2 - (\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i)^2} \quad (8)$$

$$\bar{y}_w = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \bar{y}_{ij}}{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i} = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \sum_{l=1}^L w_i y_{ijl}}{L \times \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i} \quad (9)$$

$$x_w = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i}{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i} = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \sum_{l=1}^L x_i}{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \sum_{l=1}^L w_i} \quad (10)$$

As variâncias do intercepto,  $S^2(a_w)$ , e da inclinação,  $S^2(b_w)$ , assim como a covariância entre eles,  $S^2(a_w, b_w)$ , foram dados por:

$$S^2(a_w) = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i^2}{S_{xxw}} \times K_{norm} \quad (11)$$

$$S^2(b_w) = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i}{S_{xxw}} \times K_{norm} \quad (12)$$

$$S^2(a_w b_w) = cov(a_w b_w) = -\frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i^2}{S_{xxw}} \times K_{norm} \quad (13)$$

Em que:

$$S_{xxw} = \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i (x_i - x_w)^2 = \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i^2 - (\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i)^2 \quad (14)$$

Os resíduos de regressão,  $e_{ijl}$ , bem como o resíduo ponderado,  $e_{ijlw}$ , para cada uma das  $N_y$  respostas instrumentais foram estimados por:

$$e_{yijl} = y_{ijl} - \hat{y}_i = y_{ijl} - (a_w + b_w x_i) \quad (15)$$

$$e_{yijlw} = w_i (y_{ijl} - \hat{y}_i) = w_i [y_{ijl} - (a_w + b_w x_i)] \quad (16)$$

Onde:

$y_{ijl}$  = resposta instrumental média

A partir da regressão ponderada foram calculados os  $N_y$  resíduos normalizados ou ponderados (17) para construção do gráfico de dispersão dos resíduos normalizados da regressão em função da concentração a fim de comprovar a não homogeneidade das variâncias (heterocedasticidade).

$$e_{yijl,norm} = \frac{e_{yijl}}{S_{res,y_i}} \quad (17)$$

Em que:

$S_{res, y_i}$  = desvio padrão das respostas instrumentais independentes em cada  $i$ -ésimo nível de concentração.

A avaliação dos pontos duvidosos, aberrantes ou extremos (*outliers*) da curva das respostas instrumentais de calibração foi realizada por meio da equação 18.

$$t_{yijl,calc} = \frac{|e_{yijl}|}{S_{res,\hat{y}_i}} = |e_{yijl,norm}| \quad (18)$$

Onde:

$e_{yijl}$  = resíduo de regressão, definido na equação 15

$S_{res, \hat{y}_i}$  = desvio padrão amostral das respostas instrumentais do  $i$ -ésimo nível de concentração, definido pela equação (19)

$$S_{res, \hat{y}_i} = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^J \sum_{l=1}^L (y_{ijl} - \hat{y}_i)^2}{I \times J \times L - 1}} \quad (19)$$

Se o valor de  $t_{yijl}$ , calculado para um ponto duvidoso da curva de calibração for menor ou igual ao valor de  $t_{crítico}$  tabelado,  $t_{crit, bilateral}$ , para nível de confiança igual a 95% e  $(I \times J \times L - 1)$  graus de liberdade, considera-se que o ponto pertence à curva e a faixa até ele é linear.

O coeficiente de correlação linear,  $r_w$ , e em seguida, o coeficiente de determinação,  $r^2$ , foram estimados pelas equações 21 e 22:

$$r_w = \frac{S_{xyw}}{\sqrt{S_{xxw} S_{yyw}}} \quad (20)$$

Onde:

$$S_{yyw} = \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i (\bar{y}_{ij} - \bar{y}_w)^2$$

Logo:

$$r_w = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \sum_{l=1}^L w_l \bar{y}_{ij} - \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i \sum_{l=1}^L w_l \bar{y}_{ij}}{[\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \sum_{l=1}^L w_l x_i^2 - (\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i)^2]^{1/2} \times [\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \sum_{l=1}^L w_l \bar{y}_{ij}^2 - (\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \bar{y}_{ij})^2]^{1/2}} \quad (21)$$

$$r^2 = r_w^2 \quad (22)$$

A estatística de  $t_w$  para a regressão da curva de calibração foi calculada por

$$t_{rw} = |r_w| \sqrt{\frac{N_x - 2}{1 - r_w^2}} \quad (23)$$

Se o valor de  $t_w$  para a regressão da curva de calibração for maior ou igual ao valor de  $t_{crítico}$ , tabelado,  $t_{crit, bilateral}$  para nível de confiança igual a 95% e  $(N_x - 2)$  graus de liberdade, considera-se que a faixa é linear, ou seja, rejeita-se a hipótese  $H_0: r_w=0$  de que não há correlação entre  $x$  e  $y$ .

Também foram realizados os testes Dixon para verificação da ausência de *outliers* dos resíduos calculados, Anderson-Darling, Durbin-Watson, Levene

respectivamente, para checar normalidade, independência e homocedasticidade dos resíduos, seguidos de um teste que quantidade de resíduos.

### a) Dixon

A ausência de *outliers* nos resíduos calculados foi verificada para cada nível de concentração por meio do emprego do teste estatístico Dixon. Os valores médios de resposta instrumental foram ordenados em ordem crescente em cada nível de concentração. Os menores e maiores valores foram considerados *outliers* e, depois de calculadas as razões  $\tau_{10}$ , Eq 24 e 25, para cada um dos níveis, os valores obtidos foram comparados àqueles da tabela de Dixon com um nível de confiança de 95%. Os valores calculados maiores que os valores tabelados são considerados *outliers* e foram retirados do conjunto de dados.

$$x_n \text{ suspeito} = \frac{x_n - x_{n-1}}{x_n - x_1} \quad (24)$$

$$x_1 \text{ suspeito} = \frac{x_2 - x_1}{x_n - x_1} \quad (25)$$

Foram realizados os testes Anderson-Darling, Durbin-Watson e Levene para checar a normalidade, independência e homocedasticidade dos resíduos, respectivamente.

### b) Anderson-Darling

Os resíduos,  $e_i$ , foram ordenados em ordem crescente, e a probabilidade acumulada do resíduo,  $P_i$ , foi calculada.

$$P_i = P\left(\frac{e_i - e_m}{\sigma_e}\right) \quad (26)$$

Onde:

$P$  = função de probabilidade acumulada da distribuição normal padrão

$e_m$  = média dos resíduos

$\sigma_e$  = desvio padrão dos resíduos

Em seguida, as quantidades  $h_i$ , o valor de  $A$  e a estatística  $AA$  foram calculados, conforme as equações:

$$h_i = (2i - 1)[\ln(p_i) + \ln(1 - p_{N+1-(i)})]$$

$$A = -N - h_m$$

$$AA = \left(1 + \frac{0,75}{N} + \frac{2,25}{N^2}\right) A \quad (27)$$

Em que

$h_m$  = média dos valores  $h_i$

$N$  = quantidade de dados gerados pela leitura das replicatas dos níveis da curva de calibração ( $N=N_x=N_y$ )

O  $p$ -valor, foi calculado de acordo com o valor de  $AA$  encontrado na equação 27.

$$p - valor = 1 - e^{(-13,436+101,14(AA)-22,73(AA^2))} \quad se \ AA < 0,2$$

$$p - valor = 1 - e^{(-8,318+4,796(AA)-59,938(AA^2))} \quad se \ 0,2 \leq AA < 0,34$$

$$p - valor = e^{(0,9177-0,279(AA)-1,38(AA^2))} \quad se \ 0,34 \leq AA < 0,6$$

$$p - valor = e^{(1,2937-5,709(AA)+0,0186(AA^2))} \quad se \ AA \geq 0,6$$

Calculado os  $p$ -valor, considerou-se que os resíduos seguem a distribuição normal se  $p$ -valor  $< 0,05$  e se  $p$ -valor  $\geq 0,05$  os resíduos não seguem a distribuição normal.

### c) Durbin-Watson

Para verificar a independência ou aleatoriedade dos resíduos foi empregado o teste Durbin-Watson no qual se calcula o valor de  $D$ :

$$D = \frac{(e_i - e_{i-1})^2}{\sum_{i=1}^N e_i^2} \quad (28)$$

Em que:

$e_i$  = resíduos de regressão

Os resíduos são independentes se o valor de  $D$ , calculado pela equação 28 for maior que ou igual a 1,5.

### d) Levene

O teste de Levene foi utilizado para verificar a homocedasticidade ou homogeneidade das variâncias dos resíduos. O valor de  $F$  foi calculado conforme a equação 29 e comparado ao valor tabelado considerando um nível de confiança igual a 95 % e graus de liberdade igual a  $N_x - 2$ . Se o valor de  $F$  calculado for menor ou igual ao valor tabelado os resíduos são considerados homocedásticos.

$$F_c = \frac{\frac{\sum_{j=1}^m (z_{jm} - z_m)^2}{m-1}}{\frac{\sum_{j=1}^m \sum_{u=1}^{n_j} (z_{ju} - z_{jm})^2}{\sum_{j=1}^m (n_j - 1)}} \quad (29)$$

$$z_{jm} = \frac{\sum_{u=1}^{n_j} z_{ju}}{n_j} \quad (30)$$

$$z_m = \frac{\sum_{j=1}^m \sum_{u=1}^{n_j} z_{ju}}{\sum_{j=1}^m n_j} \quad (31)$$

Em que:

$$z_{ju} = |e_i - \text{mediana}(e_i)|$$

$$z_{jm} = \text{m\u00e9dia de } z_{ju} \text{ por n\u00edvel (30)}$$

$$z_m = \text{m\u00e9dia de todos os n\u00edveis (31)}$$

### e) Teste de res\u00edduos

Um teste de quantidade de res\u00edduos foi realizado conforme a equa\u00e7\u00e3o 32. A quantidade m\u00e1xima de res\u00edduos maiores que 10 %, calculados pela equa\u00e7\u00e3o 32, n\u00e3o dever\u00e1 ultrapassar os 22%, o que significa que em um conjunto de dados contendo 30 replicatas, no m\u00e1ximo 7 res\u00edduos calculados desse conjunto poder\u00e3o retornar um valor maior que 10%.

$$\% \text{ res\u00edduos} = \frac{e_i}{\hat{y}_i} \times 100 \quad (32)$$

Na figura 10 est\u00e1 representado o esquema que contempla as etapas realizadas no experimento de determina\u00e7\u00e3o da linearidade, bem como os testes estat\u00edsticos realizados.

#### 4.3.4.3 Seletividade e efeito de matriz

A verifica\u00e7\u00e3o da seletividade e efeito de matriz foi realizada a partir da compara\u00e7\u00e3o entre as respostas instrumentais advindas do processamento da matriz digerida fortificada e do analito puro em solvente. Foram preparadas tr\u00eas replicatas independentes de cada um dos cinco n\u00edveis da curva de calibra\u00e7\u00e3o em \u00e1cido n\u00edtrico e usando o extrato da matriz branca.

##### 4.3.4.3.1 Preparo da matriz branca a partir do f\u00edgado bovino

Foram adicionados 2 g de solu\u00e7\u00e3o de \u00e1cido n\u00edtrico 22% v v<sup>-1</sup> a uma al\u00edquota de 4 g da amostra de f\u00edgado bovino. Essa amostra foi processada no UltraTurrax® Tube Drive no tubo BMT-20 com adi\u00e7\u00e3o de 10 esferas de vidro por 10 min a 4000 rpm. Em tubos MAR SXpress foram pesadas cinco al\u00edquotas de 200 mg da mistura obtida aos

quais foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio 30 %  $v v^{-1}$  e 2,8 mL de solução de ácido nítrico 22 %  $v v^{-1}$  destilado. Os tubos foram devidamente fechados e em seguida levados ao micro-ondas para digestão. Após completa digestão e resfriamento, o digerido foi transferido para um tubo Corning de 15 mL, avolumado com água 18,2  $M\Omega\cdot\text{cm}$  até 9 mL e homogeneizado. Ao final do procedimento, todas as alíquotas resultantes foram transferidas para um frasco que foi armazenado em geladeira ( $4^{\circ}\text{C}$ ) até o momento do uso. Essa solução foi utilizada no preparo da curva analítica dos estudos de seletividade e efeito de matriz, LD, LQ, precisão, recuperação, robustez e em todas as expansões de escopo.

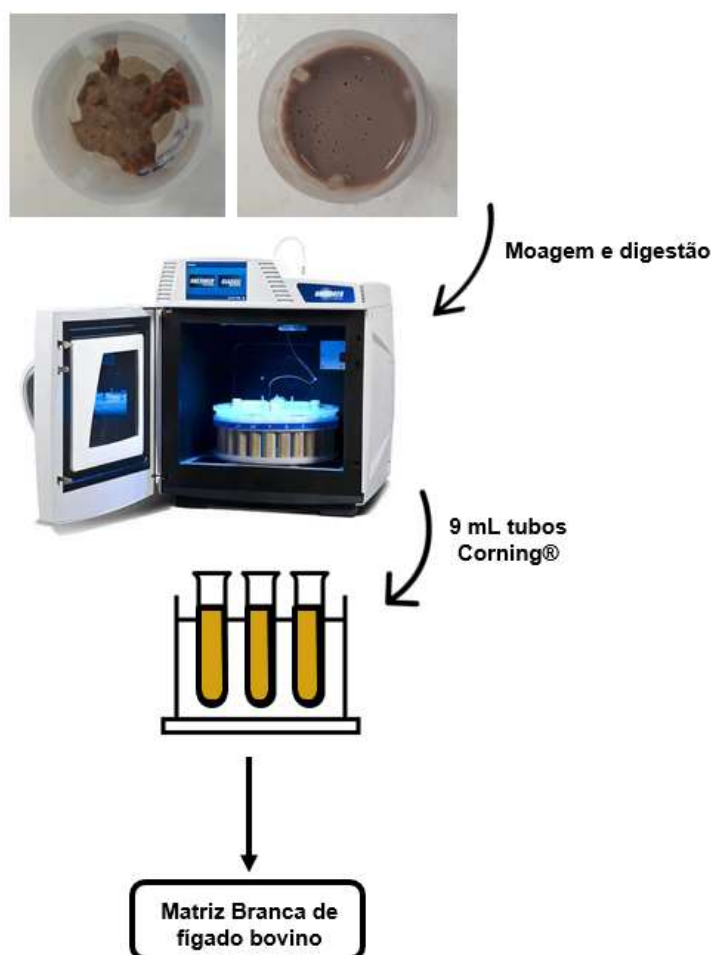


Figura 9 - Representação esquemática das etapas envolvidas no preparo da matriz branca de fígado bovino.

(Fonte: Autor)

#### 4.3.4.3.2 Estudo da seletividade e efeito de matriz

Para o preparo da curva de calibração em meio ácido foi utilizada uma solução de ácido nítrico 40 % v v<sup>-1</sup> feita a partir de ácido destilado *sub-boiling*. Foram produzidas três soluções intermediárias distintas contendo os analitos vanádio, cromo, cobalto, arsênio, cádmio, antimônio, bário, mercúrio, chumbo, urânio, lantânio, cério, praseodímio, neodímio, samário, európio, térbio, gadolínio, disprósio, hólmio, érbio, túlio, itérbio e lutécio com uma concentração igual a 125 µg L<sup>-1</sup>, molibdênio com concentração igual a 750 µg L<sup>-1</sup>, alumínio e manganês 2500 µg L<sup>-1</sup>.

A partir dessas soluções foram preparadas três replicatas de cada nível da curva de calibração por meio da adição de alíquotas iguais a 20 µL, 60 µL, 100 µL, 140 µL e 180 µL de cada solução intermediária distinta. Em cada um dos tubos foi adicionado 50 µL de uma solução de padrão interno contendo 250 µg L<sup>-1</sup> de índio, irídio e bismuto; 500 µg L<sup>-1</sup> de germânio e 2000 µg L<sup>-1</sup> de ródio e 625 µL da solução de ácido nítrico 40 % v v<sup>-1</sup>. Uma solução contendo apenas ácido nítrico e solução padrão interno foi preparada para cada triplicata da curva de calibração. Ao final, o volume foi completado até 5 mL com água 18,2 MΩ.cm.

Para a determinação dos elementos cobre, ferro e zinco foram preparadas curvas de calibração distintas em triplicata, nas quais foram adicionados 20 µL, 60 µL, 100 µL, 140 µL e 180 µL de cada solução intermediária preparada, em triplicata, contendo 750 µg L<sup>-1</sup> de ferro e zinco e 2500 µg L<sup>-1</sup> de cobre. Em cada um dos tubos foi adicionado 50 µL de uma solução de padrão interno contendo 2000 µg L<sup>-1</sup> de escândio e 5000 µg L<sup>-1</sup> de gálio e 625 µL da solução de ácido nítrico 40 % v v<sup>-1</sup>. Uma solução contendo apenas ácido nítrico e solução padrão interno foi preparada para cada triplicata da curva de calibração. Ao final, o volume foi completado até 5 mL com água 18,2 MΩ.cm.

A curva de calibração em extrato de matriz branca foi produzida, em triplicata, a partir da adição de 3750 µL do extrato digerido da matriz branca em cada alíquota, seguido da adição de 20 µL, 60 µL, 100 µL, 140 µL e 180 µL de cada uma das três soluções intermediárias distintas contendo os analitos vanádio, cromo, cobalto, arsênio, cádmio, antimônio, bário, mercúrio, chumbo, urânio, lantânio, cério, praseodímio, neodímio, samário, európio, térbio, gadolínio, disprósio, hólmio, érbio, túlio, itérbio e lutécio com uma concentração igual a 125 µg L<sup>-1</sup>, molibdênio com concentração igual a 750 µg L<sup>-1</sup>, alumínio e manganês 2500 µg L<sup>-1</sup> e 50 µL de uma

solução de padrão interno contendo  $250 \mu\text{g L}^{-1}$  de índio, irídio e bismuto;  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  de germânio e  $2000 \mu\text{g L}^{-1}$  de ródio. Em seguida o volume foi completado até 5 mL com água  $18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ . Para a avaliação dos elementos cobre, ferro e zinco foram preparadas curvas de calibração distintas em triplicata, nas quais foram adicionados  $75 \mu\text{L}$  do extrato digerido da matriz branca  $20 \mu\text{L}$ ,  $60 \mu\text{L}$ ,  $100 \mu\text{L}$ ,  $140 \mu\text{L}$  e  $180 \mu\text{L}$  de cada solução intermediária preparada, em triplicata, contendo  $750 \mu\text{g L}^{-1}$  de ferro e zinco e  $2500 \mu\text{g L}^{-1}$  de cobre. Em cada um dos tubos foi adicionado  $50 \mu\text{L}$  de uma solução de padrão interno contendo  $2000 \mu\text{g L}^{-1}$  de escândio e  $5000 \mu\text{g L}^{-1}$  de gálio,  $625 \mu\text{L}$  da solução de ácido nítrico  $40 \% \text{ v v}^{-1}$  e o volume foi completado até 5 mL com água  $18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ .

As concentrações finais de cada um dos analitos nas curvas preparadas foi igual à determinada na faixa de trabalho, ou seja  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $1,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $3,5 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $4,5 \mu\text{g L}^{-1}$  de vanádio, cromo, cobalto, arsênio, cádmio, antimônio, bário, mercúrio, chumbo, urânio, lantânio, cério, praseodímio, neodímio, samário, európio, térbio, gadolínio, disprósio, hólmio, érbio, túlio, itérbio e lutécio;  $3 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $9 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $15 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $21 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $27 \mu\text{g L}^{-1}$  para os elementos molibdênio, ferro e zinco e  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $30 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $50 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $70 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $90 \mu\text{g L}^{-1}$  para os elementos alumínio, manganês e cobre.

As soluções assim preparadas foram lidas em duplicata, inclusive as soluções de mesma concentração, e em ordem aleatória. Entre cada leitura foi utilizada uma solução de  $\text{HNO}_3$   $5\% \text{ v v}^{-1}$  para limpeza do sistema de introdução de amostras como cuidado para evitar contaminação cruzada. Com os dados obtidos dos experimentos usando a curva em meio ácido e a dos digeridos da matriz branca fortificados, prosseguiu-se o cálculo para definição da equação de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ponderados relativo, por meio do qual foram feitas as estimativas da interseção,  $a_w$ , e inclinação,  $b_w$ , as variâncias do intercepto e inclinação,  $S_{a,w}^2$  e  $S_{b,w}^2$ , respectivamente, seguidos de todos os testes estatísticos realizados nos dados obtidos na linearidade.

A comparação dos interceptos e inclinações das curvas em meio ácido e em digerido de matriz branca foi feita para averiguar a existência do efeito de matriz a partir do teste  $t$  de Student para verificar a igualdade estatística dos interceptos  $a_1$  e  $a_2$  e das inclinações  $b_1$  e  $b_2$ , aplicando-se o teste  $F$  (Fischer-Snedecor) de homogeneidade de variâncias para verificar se as variâncias dos interceptos da curva

de calibração em meio ácido e em extrato de matriz digerido são estatisticamente iguais, calculando-se:

$$F_{a,calc} = \frac{S_{a,1}^2}{S_{a,2}^2} \quad (33)$$

Em que:

$S_{a,1}^2$  e  $S_{a,2}^2$  = são as variâncias dos interceptos da curva de calibração em meio ácido e em extrato de matriz digerido, com a maior variância no denominador.

O valor de  $F_{(a,crit,\alpha, v_1, v_2)}$  com  $v_1 = N_{x1}-1$  graus de liberdade no numerador e  $v_2 = N_{x2}-1$  graus de liberdade no denominador foi obtido com um nível de confiança de 95%. Quando  $F_{a, calc}$  for menor que  $F_{(a,crit,\alpha, v_1, v_2)}$ , as variâncias podem ser consideradas iguais e os desvios-padrão dos dois interceptos são agrupados para formar o desvio padrão agrupado,  $S_{a,p}$ , e a igualdade dos dois interceptos testada com a distribuição de  $t$  de Student. O valor tabelado de  $t(a,\alpha, v)$  foi obtido a partir da tabela de distribuição de  $t$  de Student para  $v = N_{x1} + N_{x2} - 2$  graus de liberdade e o nível de significância igual a 0,05% ou nível de confiança iguala 95%.

$$t_{a,calc} = \frac{|a_1 - a_2|}{\sqrt{S_{a,p}^2 \left( \frac{1}{N_{x1}} + \frac{1}{N_{x2}} \right)}} \quad (34)$$

Em que:

$$S_{a,p}^2 = \frac{(N_{x1}-1)S_{a1}^2 + (N_{x2}-1)S_{a2}^2}{(N_{x1} + N_{x2} - 2)} \quad (35)$$

$N_{x1}$  e  $N_{x2}$  são os números de níveis de concentração independentemente replicados das curvas de calibração em meio ácido e em extrato de matriz digerido.

Quando  $F_{a, calc}$  for maior que  $F_{(a,crit,\alpha, v_1, v_2)}$  tabelado as variâncias não podem ser consideradas estatisticamente iguais e o efeito da matriz é verificado com a distribuição  $t$  de Student, por meio da seguinte equação:

$$t_{a,calc} = \frac{|a_1 - a_2|}{\sqrt{\frac{S_{a1}^2}{N_{x1}} + \frac{S_{a2}^2}{N_{x2}}}} \quad (36)$$

No caso de  $F_{a, calc}$  maior que  $F_{(a,crit,\alpha, v_1, v_2)}$ , o valor crítico tabelado  $t(a, crit,\alpha, v)$  é obtido com número de graus de liberdade igual a :

$$v = \frac{\left( \frac{S_{a1}^2}{N_{x1}} + \frac{S_{a2}^2}{N_{x2}} \right)^2}{\frac{S_{a1}^2/N_{x1}}{N_{x1}+1} + \frac{S_{a2}^2/N_{x2}}{N_{x2}+1}} - 2 \quad (37)$$

Quando o valor de  $t(a, calc)$  for menor que  $t(a, crit,\alpha, v)$  conclui-se que as curvas analíticas, em meio ácido e em extrato de matriz branca digerido, têm o mesmo

intercepto. Quando o valor de  $t_{(a, calc)}$  for menor que  $t_{(a, crit, \alpha, v)}$  conclui-se que as curvas analíticas possuem interceptos diferentes. Os testes F e t foram repetidos para as inclinações,  $b_1$  e  $b_2$ , usando as mesmas equações (33 a 37) e os resultados foram obtidos considerando os mesmos parâmetros.

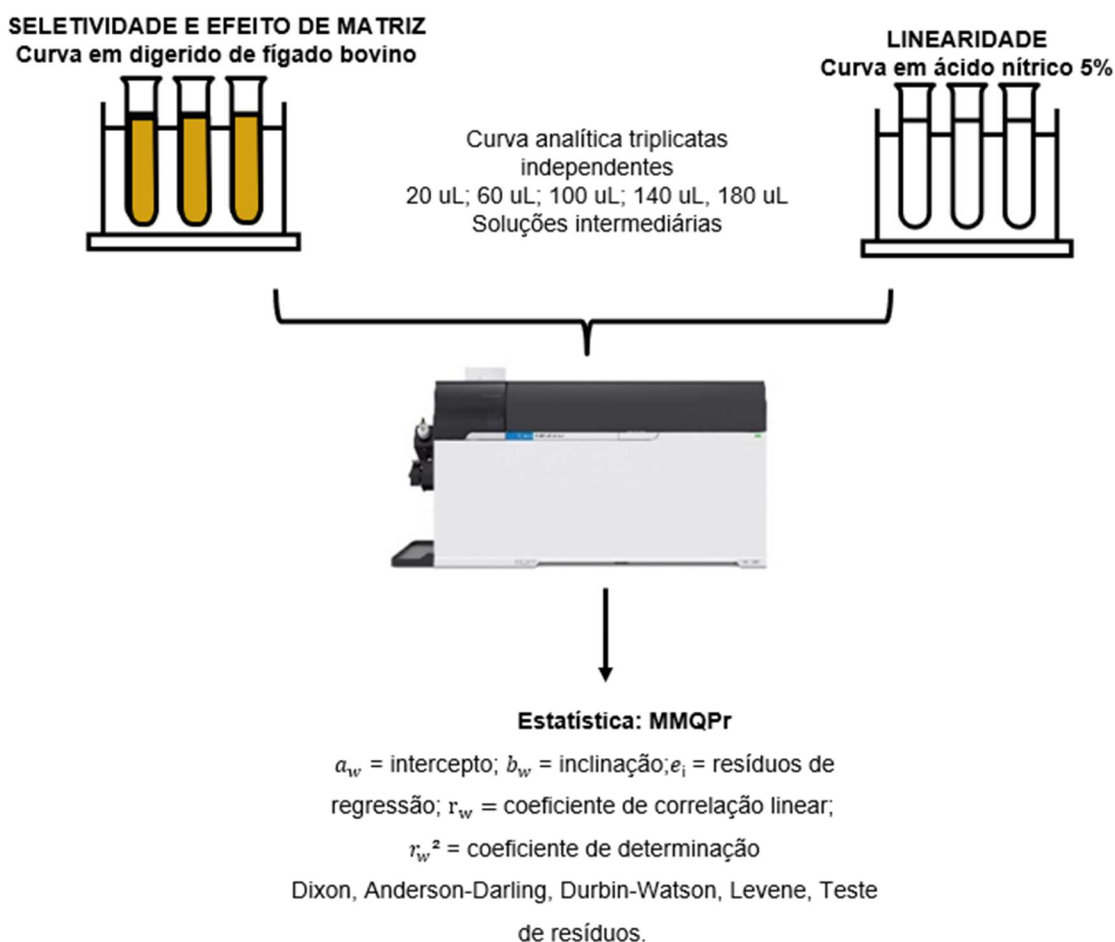


Figura 10 - Representação esquemática das etapas envolvidas no experimento de linearidade e seletividade.

(Fonte: Autor)

#### 4.3.4.4 Limite de detecção e quantificação

Para determinação do limite de detecção (LD), a curva de calibração em extrato da matriz branca digerida foi preparada em triplicata a partir de soluções intermediárias independentes. Foi feita a adição de uma alíquota de 3750  $\mu\text{L}$  do extrato digerido da matriz branca, seguido da adição de 20  $\mu\text{L}$ , 60  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$ , 140  $\mu\text{L}$  e 180  $\mu\text{L}$  de cada uma das três soluções intermediárias distintas contendo os analitos

vanádio, cromo, cobalto, arsênio, cádmio, antimônio, bário, mercúrio, chumbo, urânio, lantânio, cério, praseodímio, neodímio, samário, európio, térbio, gadolínio, disprósio, hólmio, érbio, túlio, itérbio e lutécio com uma concentração igual a  $125 \mu\text{g L}^{-1}$ , molibdênio com concentração igual a  $750 \mu\text{g L}^{-1}$ , alumínio e manganês  $2500 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $50 \mu\text{L}$  de uma solução de padrão interno contendo  $250 \mu\text{g L}^{-1}$  de índio, irídio e bismuto;  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  de germânio e  $2000 \mu\text{g L}^{-1}$  de ródio. Em seguida o volume foi completado até  $5 \text{ mL}$  com água  $18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ . Para a determinação dos elementos cobre, ferro e zinco foram construídas curvas de calibração distintas em triplicata, nas quais foram adicionados  $75 \mu\text{L}$  do extrato digerido da matriz branca  $20 \mu\text{L}$ ,  $60 \mu\text{L}$ ,  $100 \mu\text{L}$ ,  $140 \mu\text{L}$  e  $180 \mu\text{L}$  de cada solução intermediária preparada, em triplicata, contendo  $750 \mu\text{g L}^{-1}$  de ferro e zinco e  $2500 \mu\text{g L}^{-1}$  de cobre. Em cada um dos tubos foi adicionado  $50 \mu\text{L}$  de uma solução de padrão interno contendo  $2000 \mu\text{g L}^{-1}$  de escândio e  $5000 \mu\text{g L}^{-1}$  de gálio,  $625 \mu\text{L}$  da solução de ácido nítrico  $40 \% \text{ v v}^{-1}$  e o volume foi completado até  $5 \text{ mL}$  com água  $18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ .

Para o preparo das replicatas da matriz branca para o estudo do LD, inicialmente foram adicionados  $2 \text{ g}$  de solução de ácido nítrico  $22\% \text{ v v}^{-1}$  a uma alíquota de  $4 \text{ g}$  da amostra de fígado bovino. Essa amostra foi processada no UltraTurrax® Tube Drive no tubo BMT-20 com adição de 10 bolinhas de vidro por  $10 \text{ min}$  a uma rotação de  $4000 \text{ rpm}$ . Em tubos MARSXpress foram pesadas vinte e uma alíquotas de  $200 \text{ mg}$  da mistura obtida às quais foram adicionados  $200 \mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio  $30 \% \text{ v v}^{-1}$  e  $2,8 \text{ mL}$  de solução de ácido nítrico  $22 \% \text{ vv}^{-1}$  destilado. Os tubos foram devidamente fechados e em seguida levados ao micro-ondas para digestão. Após completa digestão e resfriamento, cada uma das alíquotas foi transferida quantitativamente para um tubo Corning de  $15 \text{ mL}$ , contendo  $120 \mu\text{L}$  de uma solução de padrão interno contendo  $250 \mu\text{g L}^{-1}$  de índio, irídio e bismuto;  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  de germânio e  $2000 \mu\text{g L}^{-1}$  de ródio, avolumado com água  $18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$  até  $12 \text{ mL}$  e homogeneizadas. Essas soluções foram armazenadas em geladeira a  $4^\circ\text{C}$  e utilizadas na avaliação do LD dos analitos vanádio, cromo, cobalto, arsênio, cádmio, antimônio, bário, mercúrio, chumbo, urânio, lantânio, cério, praseodímio, neodímio, samário, európio, térbio, gadolínio, disprósio, hólmio, érbio, túlio, itérbio, lutécio, molibdênio, alumínio e manganês.

Para a avaliação do LD dos analitos cobre, ferro e zinco, as soluções anteriormente preparadas foram diluídas. Em um tubo Corning®, contendo  $120 \mu\text{L}$  de uma solução de padrão interno contendo  $2000 \mu\text{g L}^{-1}$  de escândio e  $5000 \mu\text{g L}^{-1}$  de

gálio e 1 mL da solução de ácido nítrico 40 % v v<sup>-1</sup>, foram adicionados 200 µL das soluções digeridas e avolumadas e o volume foi completado até 10 mL com água 18,2 MΩ.cm. Essas soluções foram devidamente homogeneizadas e preparadas no mesmo dia da leitura.

Com os dados obtidos dos experimentos usando a curva em extrato da matriz branca, prosseguiu-se o cálculo para definição da equação de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ponderados relativo, por meio do qual foram feitas as estimativas da interseção,  $a_w$ , e inclinação,  $b_w$ , bem como todos os testes realizados nas variâncias do intercepto e inclinação,  $S_{a,w}^2$  e  $S_{b,w}^2$ , respectivamente e covariância entre a e b. Também foi feito estimado o coeficiente de correlação,  $r_w$ , e a estatística,  $t_{rw}$  para a regressão da curva de calibração, além da verificação de *outliers*, por meio da utilização do teste de Dixon e o teste de resíduos conforme a equação 32.

Com os dados obtidos das leituras das 21 replicatas da matriz branca foram calculadas as concentrações de cada analito, por meio da equação de regressão linear, cujos parâmetros foram determinados pelo método dos mínimos quadrados ponderados. O teste de Grubbs foi utilizado para verificação de *outliers*, conforme equação:

$$G = \frac{X_0 - \bar{X}}{S} \quad (38)$$

Em que:

$X_0$  = valor suspeito

$\bar{X}$  = média dos dados

S = desvio padrão em relação à média

Nesse teste, os valores de concentração calculados foram organizados em ordem crescente, e o menor e o maior valor foram considerados como *outliers*. Calculados os valores de G para o menor e o maior valor, se  $G_{\text{calculado}}$  maior que  $G_{\text{tabelado}}$ , para um intervalo de confiança igual a 95%, então o valor é considerado um *outlier* e deve ser removido. O número máximo de *outliers* que pode ser removido é 22 %. O LD foi calculado para cada um dos analitos por meio da equação:

$$LD = 3 \times s \quad (39)$$

O Limite de Quantificação (LQ) foi determinado com os dados obtidos pela leitura das 21 replicatas da matriz branca usando a equação a seguir:

$$LQ = 10 \times s \quad (40)$$

Em que:

s = desvio-padrão da média dos ensaios com matriz branca.

Para confirmação do valor de LQ, 7 replicatas de extrato da matriz branca foram fortificadas no menor nível da curva de calibração e analisados. O valor da concentração foi determinado por meio da regressão linear. O desvio em relação à concentração fortificada foi determinado por:

$$\% \text{ desvio} = \frac{C_{\text{medida}}}{C_{\text{fortificada}}} \times 100 \quad (40)$$

Os resultados esperados para a recuperação na confirmação do LQ devem atender os critérios definidos na Tabela 7 conforme estabelecido pelo MAPA.

Tabela 7 - Valores de recuperação, repetitividade e reprodutibilidade

Concentração / $\mu\text{g kg}^{-1}$	Intervalo / %
$\leq 1$	50 a 120
> 1 a 10	70 a 110
$\geq 10$	80 a 110

Fonte: (Brasil, 2011)

Na figura abaixo está representado o esquema que resume as etapas do processo de determinação do LD e LQ.

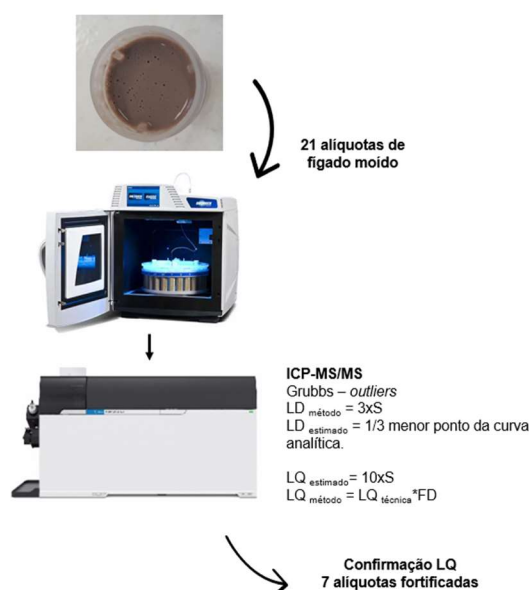


Figura 11 - Representação esquemática das etapas de determinação do LD e LQ.

(Fonte: Autor)

#### 4.3.4.5 Precisão

A precisão do método foi avaliada por meio da repetitividade e da precisão intermediária.

##### 4.3.4.5.1 Repetitividade

Foram adicionados 2 g de solução de ácido nítrico 22% v v<sup>-1</sup> a uma alíquota de 4 g da amostra de fígado bovino. Essa amostra foi processada no UltraTurrax Tube Drive ® no tubo BMT-20 com adição de 10 bolinhas de vidro por 10 min a 4000 rpm. Em tubos MARSXpress foram pesadas 15 alíquotas de 200 mg da mistura obtida aos quais foram adicionados 200 µL de peróxido de hidrogênio 30 % vv<sup>-1</sup> e 2,8 mL de solução de ácido nítrico 22 % vv<sup>-1</sup> destilado. Foram adicionados às primeiras 6 alíquotas e às 6 últimas alíquotas, respectivamente, 48 µL e 240 µL de uma solução de fortificação contendo 125 µg L<sup>-1</sup> de vanádio, cromo, cobalto, arsênio, cádmio, antimônio, bário, mercúrio, chumbo, urânio, lantânio, cério, praseodímio, neodímio, samário, európio, térbio, gadolínio, disprósio, hólmio, érbio, túlio, itérbio, lutécio; 750 µg L<sup>-1</sup> de molibdênio; 2500 µg L<sup>-1</sup> de alumínio e manganês; 37,5 mg L<sup>-1</sup> de ferro e zinco e 100 mg L<sup>-1</sup> de cobre. Às três últimas alíquotas foram adicionados apenas 200 µL de peróxido de hidrogênio 30 % v v<sup>-1</sup> e 2,8 mL de solução de ácido nítrico 22 % v v<sup>-1</sup> destilado para obtenção dos brancos de procedimento. Os tubos foram devidamente fechados e em seguida levados ao micro-ondas para digestão. Após completa digestão e resfriamento, o digerido foi transferido para um tubo Corning® de 15 ml, contendo 120 µL de uma solução de padrão interno contendo 250 µg L<sup>-1</sup> de índio, irídio e bismuto; 500 µg L<sup>-1</sup> de germânio e 2000 µg L<sup>-1</sup> de ródio e avolumado com água 18,2 MΩ.cm até 12 mL e homogeneizado. As soluções assim obtidas foram utilizadas para avaliação da repetitividade dos analitos vanádio, cromo, cobalto, arsênio, cádmio, antimônio, bário, mercúrio, chumbo, urânio, lantânio, cério, praseodímio, neodímio, samário, európio, térbio, gadolínio, disprósio, hólmio, érbio, túlio, itérbio, lutécio, molibdênio, alumínio e manganês no nível mais baixo e intermediário da curva de calibração. Para a avaliação da repetitividade de cobre, ferro e zinco foi feita uma diluição de 50 vezes mediante adição de 200 µL de cada uma das soluções obtidas, 100 µL da solução padrão interno contendo 2000 µg L<sup>-1</sup> de escândio e 5000 µg L<sup>-1</sup> de gálio e 1 mL da solução de ácido nítrico 40 % v v<sup>-1</sup> em um tubo Corning® de 15 mL.

Finalmente, o volume final foi completado até 10 mL com água 18,2 MΩ.cm e as soluções homogêneas. Esses últimos analitos foram igualmente avaliados no nível mais baixo e intermediário da curva de calibração.

Para avaliação da repetitividade, inicialmente a curva de calibração em extrato da matriz branca digerida foi preparada em triplicata a partir de soluções intermediárias independentes. Foi feita a adição de 3750 µL do extrato digerido da matriz branca em cada alíquota, seguido da adição de 20 µL, 60 µL, 100 µL, 140 µL e 180 µL de cada uma das três soluções intermediárias distintas contendo os analitos vanádio, cromo, cobalto, arsênio, cádmio, antimônio, bário, mercúrio, chumbo, urânio, lantânio, cério, praseodímio, neodímio, samário, európio, térbio, gadolínio, disprósio, hólmio, érbio, túlio, itérbio e lutécio com uma concentração igual a 125 µg L<sup>-1</sup>, molibdênio com concentração igual a 750 µg L<sup>-1</sup>, alumínio e manganês 2500 µg L<sup>-1</sup> e 50 µL de uma solução de padrão interno contendo 250 µg L<sup>-1</sup> de índio, irídio e bismuto; 500 µg L<sup>-1</sup> de germânio e 2000 µg L<sup>-1</sup> de ródio. Em seguida o volume foi completado até 5 mL com água 18,2 MΩ.cm.

Para a determinação dos elementos cobre, ferro e zinco foram feitas curvas de calibração distintas em triplicata, nas quais foram adicionados 75 µL do extrato digerido da matriz branca 20 µL, 60 µL, 100 µL, 140 µL e 180 µL de cada solução intermediária preparada, em triplicata, contendo 750 µg L<sup>-1</sup> de ferro e zinco e 2500 µg L<sup>-1</sup> de cobre. Em cada um dos tubos foi adicionado 50 µL de uma solução de padrão interno contendo 2000 µg L<sup>-1</sup> de escândio e 5000 µg L<sup>-1</sup> de gálio, 625 µL da solução de ácido nítrico 40 % v v<sup>-1</sup> e o volume foi completado até 5 mL com água 18,2 MΩ.cm.

A curva de calibração foi analisada em ordem aleatória e, a partir dos dados obtidos tanto da curva quanto dos digeridos das amostras brancas fortificadas e amostras brancas sem fortificação, a concentração de cada replicata, a concentração média para cada nível de adição, o desvio padrão ( $s_r$ ) e o desvio padrão em condições de repetitividade ( $RSD_r$ ) foram calculados. O desvio padrão relativo teórico para cada nível de concentração,  $RSD_{Horwitz}$ , o valor de HORRAT em condições de repetitividade,  $HORRAT_r$  e o limite de repetitividade,  $r$ , foram calculados de acordo com as seguintes equações:

$$RSD_{Hoewitz} = 2^{(1-0,5 \log C)} \quad (41)$$

Em que C: Concentração nominal do nível em µg kg<sup>-1</sup> x 10<sup>-9</sup>

$$HORRAT_r = \frac{DPR_r}{PDPR_R} \quad (42)$$

Onde:

DPR<sub>r</sub>: desvio padrão relativo da média

PDPR<sub>R</sub>: desvio padrão relativo predito =  $2 C^{-0,15}$

C: Concentração nominal do nível em  $\mu\text{g kg}^{-1} \times 10^{-9}$

$$r = 2,8 \times S_r$$

De acordo com o critério estabelecido pelo MAPA, o desvio padrão relativo (DPR<sub>r</sub>) da média deve ser menor que dois terços que o RSD<sub>Hortwitz</sub> e os valores de HORRAT<sub>r</sub> menores que 1 para cada nível de concentração estudado.

Também foram calculadas as recuperações em cada uma das replicatas e a recuperação média para cada analito. Os valores de recuperação alcançados dependem da faixa de concentração conforme a Tabela 7.

#### 4.3.4.5.2 Precisão intermediária

Para avaliação da precisão intermediária o experimento foi repetido em dia diferente e por outro analista, digerindo-se as amostras brancas fortificadas nos mesmos níveis de concentração e as amostras brancas sem fortificação em iguais condições de reprodutibilidade. Além destas, as curvas de calibração em triplicata, bem como a solução de fortificação foram preparadas novamente. A curva de calibração foi analisada em ordem aleatória e a partir dos dados obtidos tanto da curva quanto dos digeridos das amostras brancas fortificadas, foram feitos os cálculos da concentração obtida para cada replicata e da concentração média, do desvio padrão, do desvio padrão relativo global de cada nível, do valor de HORRAT em condições de reprodutibilidade interlaboratorial, HORRAT<sub>R</sub> e do limite de reprodutibilidade, R.

$$HORRAT_R = \frac{DPR_R}{PDPR_R} \quad (43)$$

$$R = 2,8 \times S_R \quad (44)$$

DPR<sub>R</sub>: desvio padrão relativo global

PDPR<sub>R</sub>: desvio padrão relativo predito =  $2 C^{-0,15}$

C: Concentração nominal do nível em  $\mu\text{g kg}^{-1} \times 10^{-9}$

S<sub>R</sub>: desvio padrão global

De acordo com o critério estabelecido pelo MAPA, o desvio padrão relativo (DRP<sub>R</sub>) não deve exceder o valor do desvio padrão relativo de Hortwitz e os valores

HORRAT<sub>R</sub> devem ser inferiores a 1. A Figura 12 representa as etapas do processo de estudo da precisão do método.



Figura 12 - Representação esquemática das etapas de estudo da precisão do método.

(Fonte: Autor)

#### 4.3.4.6 Veracidade: Recuperação

Para avaliação da recuperação, foram analisadas três replicatas da matriz branca sem fortificação e outras seis replicatas após fortificação com os padrões de calibração no nível de concentração baixo e médio. Outras seis replicatas foram preparadas sob as mesmas condições e analisadas em dias diferentes. As replicatas de matriz branca com e sem fortificação foram preparadas e analisadas exatamente

como descrito na etapa de precisão. Com os dados obtidos na leitura, o fator de recuperação,  $f_{rec}$ , para cada analito foi determinado por:

$$f_{rec} = \frac{c_f - c_{nf}}{c_{ad}} \times 100 \quad (45)$$

Onde:

$C_f$  = teor medido após fortificação da matriz branca

$C_{nf}$  = teor medido na matriz branca não fortificada

$C_{ad}$  = teor do analito puro adicionado à matriz branca

A veracidade do procedimento analítico deve estar compreendida ao redor de 100%, de acordo com as respectivas faixas de concentrações. A tabela 6 apresenta os critérios de aceitação para a veracidade aplicáveis à análise de resíduos e contaminantes em produtos de origem animal.

#### 4.3.4.7 Robustez

O teste de Youden foi empregado para avaliação da robustez do método. Os fatores analisados, seus valores nominais e valores de variação estão descritos na Tabela 8. Foi escolhida uma taxa de variação de 10 % para os fatores numéricos.

Tabela 8 - Fatores estudados na robustez

Fator	Nome do fator	Nível baixo	Nível alto
1	Massa de amostra da trituração (g)	3,6	4,0
2	Massa de HNO <sub>3</sub> da trituração (g)	1,8	2,0
3	Volume de HNO <sub>3</sub> da digestão (mL)	2,5	2,8
4	Volume de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> da digestão (mL)	0,18	0,2
5	Massa de amostra triturada da digestão (mg)	180	200
6	Lavagem da parede dos tubos	Não	Sim
7	Capela	Exaustão	Fluxo

(Fonte: Autor)

Definidos os fatores e valores de variação, os experimentos de 1 a 8 foram executados de acordo com a Tabela 9:

Tabela 9 - Condições experimentais no estudo de robustez

Fatores		N° experimento							
Nome do fator	1	2	3	4	5	6	7	8	
Massa de amostra da trituração (g)	4	4	4	4	3,6	3,6	3,6	3,6	
Massa de HNO <sub>3</sub> da trituração (g)	2	2	1,8	1,8	2	2	1,8	1,8	
Volume de HNO <sub>3</sub> da digestão (mL)	2,8	2,5	2,8	2,5	2,8	2,5	2,8	2,5	
Volume de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> da digestão (mL)	0,2	0,2	0,18	0,18	0,18	0,18	0,2	0,2	
Massa de amostra triturada da digestão (mg)	200	180	200	180	180	200	180	200	
Lavagem da parede dos tubos	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	
Capela - Fluxo Laminar (F) ou Exaustão (E)	F	E	E	F	E	F	F	E	

(Fonte: Autor)

Para realização do experimento 1, foram adicionados 2 g de solução de ácido nítrico 22% v v<sup>-1</sup> a uma alíquota de 4 g da amostra de fígado bovino. Essa amostra foi processada no UltraTurrax Tube Drive® no tubo BMT-20 com adição de 10 bolinhas de vidro por 10 min a 4000 rpm. Em tubos MARSXpress foram pesadas 2 alíquotas de 200 mg da mistura obtida aos quais foram adicionados 200 µL de peróxido de hidrogênio 30 % v v<sup>-1</sup> e 2,8 mL de solução de ácido nítrico 22 % v v<sup>-1</sup> destilado. Foi adicionado em cada replicata 240 µL de uma solução de fortificação contendo 125 µg L<sup>-1</sup> de vanádio, cromo, cobalto, arsênio, cádmio, antimônio, bário, mercúrio, chumbo, urânio, lantânio, cério, praseodímio, neodímio, samário, európio, térbio, gadolínio, disprósio, hólmio, érbio, túlio, itérbio, lutécio; 750 µg L<sup>-1</sup> de molibdênio; 2500 µg L<sup>-1</sup> de alumínio e manganês; 37,5 mg L<sup>-1</sup> de ferro e zinco e 100 mg L<sup>-1</sup> de cobre. Todos os reagentes e soluções foram adicionados em capela de fluxo laminar. Os tubos foram devidamente fechados e em seguida levados ao micro-ondas para digestão. Após completa digestão e resfriamento, o digerido foi transferido para um tubo Corning® de 15 ml contendo 120 µL de uma solução de padrão interno contendo 250 µg L<sup>-1</sup> de índio, irídio e bismuto; 500 µg L<sup>-1</sup> de germânio e 2000 µg L<sup>-1</sup> de ródio. No procedimento de transferência as paredes do tubo MARSXpress foram devidamente lavadas e as porções transferidas para o tubo Corning® que foi avolumado com água 18,2 MΩ.cm até 12 mL e homogeneizado. As etapas de adição de padrão interno, bem como transferência para os tubos Corning® foram feitas em capela de exaustão.

As replicatas obtidas nos experimentos 2 a 8 foram obtidas pela variação dos fatores previamente definidos, apenas alterando os seus valores e condições no momento do preparo conforme descrito na tabela 8. As condições de operação do micro-ondas foram as mesmas em todos os experimentos bem como as condições de transferência dos digeridos, às quais todas feitas em capela de exaustão. Para a avaliação da robustez de cobre, ferro e zinco foi feita uma diluição de 50 vezes de todas as replicatas obtidas nos experimentos de 1 a 8 mediante adição de 200 µL de cada uma das soluções, 100 µL da solução padrão interno contendo 2000 µg L<sup>-1</sup> de escândio e 5000 µg L<sup>-1</sup> de gálio e 1 mL da solução de ácido nítrico 40 % v v<sup>-1</sup> em um tubo Corning® de 15 mL. Finalmente, o volume final foi completado até 10 mL com água 18,2 MΩ.cm e as soluções homogeneizadas. As replicatas dos 8 experimentos foram analisadas aleatoriamente, inclusive as replicatas de cada combinação, e os dados obtidos foram avaliados. Nessa etapa, a curva de calibração não foi utilizada, pois para avaliação da robustez apenas a resposta instrumental de cada analito e suas possíveis alterações com as variações nas condições experimentais é importante.

Inicialmente, calculou-se a média e a variância para cada combinação de ensaio. Para determinação do efeito de um fator (D<sub>i</sub>), calculou-se a diferença entre a média de resposta instrumental (RI) para o analito corrigido pelo padrão interno nos experimentos de 1 a 4 e a média de resposta instrumental nos experimentos de 5 a 8, conforme equação 46.

$$D_i = \frac{(RI_1+RI_2+RI_3+RI_4)}{4} - \frac{(RI_5+RI_6+RI_7+RI_8)}{4} \quad (46)$$

Em seguida, a variância de todos os efeitos foi estimada por

$$s^2 = \frac{(v_1s_1^2+v_2s_2^2+v_3s_3^2+v_4s_4^2+v_5s_5^2+v_6s_6^2+v_7s_7^2+v_8s_8^2)}{v_1+v_2+v_3+v_4+v_5+v_6+v_7+v_8} \quad (47)$$

Onde:

v<sub>i</sub>: n<sub>i</sub>-1 é o número de graus de liberdade de s<sub>i</sub><sup>2</sup>; a estimativa da variância do i-ésimo ensaio.

Logo depois, foi calculado o erro padrão do efeito (equação 48), o qual foi multiplicado pelo valor de *t* de Student para oito graus de liberdade, com 95% de confiança, para encontrar o valor de significância dos efeitos.

$$Erro = \frac{\sqrt{s^2}}{2} \quad (48)$$

$$Valor\ de\ significância = Erro \times 2,306 \quad (49)$$

Em seguida, empregando o teste F, foi feito o cálculo para verificação de diferença estatística significativa entre os valores obtidos nos experimentos de 1 a 4 e 5 a 8 e finalmente, o desvio padrão dos efeitos,  $S_{D_i}$ , foi calculado:

$$S_{D_i} = \sqrt{2 \times \sum \left( \frac{D_i^2}{7} \right)} \quad (50)$$

Se o valor de algum efeito ultrapassar o valor de significância, estimado pela equação 49, pode-se considerá-lo significativo e recomenda-se implantar um controle nesta etapa do processo. O método será considerado robusto de F tabelado for maior que o valor de F calculado. O valor de  $S_{D_i}$  deve ser menor que o desvio padrão obtido em condições de reprodutibilidade intralaboratorial. Se o valor de  $S_{D_i}$  for significativamente maior que o desvio padrão do método, em condições de reprodutibilidade intralaboratorial, pode deduzir-se que o conjunto de fatores têm influência no resultado, mesmo que cada fator isoladamente não influencie significativamente, e que o método não é suficientemente robusto face às alterações ensaiadas.

#### **4.3.5 Expansão de escopo**

Foram feitos experimentos com o intuito de ampliar o escopo para o procedimento validado para fígado bovino. Foi feito um estudo de linearidade, seletividade, efeito de matriz, recuperação e precisão com as novas matrizes: fígado de galinha, fígado, músculo e brânquias de tilápia, fígado e rim de porco e rim e sangue bovino hemolisado (condição na qual há rompimento da membrana das hemácias e conseqüente lançamento de hemoglobina e outras substâncias no meio circundante). As amostras de fígado de galinha, fígado de porco e rim bovino e de porco foram obtidas em mercados locais. As amostras de fígado, músculo, brânquias de tilápia e sangue bovino foram obtidas da Escola de Veterinária da UFMG. Essas amostras foram mantidas em temperatura de -20 °C até o início dos procedimentos.

##### **4.3.5.1 Preparo da matriz branca de tecidos animais**

O preparo de cada uma das novas matrizes brancas, fígado e rim suíno, fígado, musculatura e brânquias de tilápia, fígado de galinha e rim bovino, se deu mediante

adição 2 g de solução de ácido nítrico 22% v v<sup>-1</sup> a uma alíquota de 4 g da amostra de cada nova matriz. Essa amostra foi processada no UltraTurrax Tube Drive ® no tubo BMT-20 com adição de 10 esferas de vidro por 10 min a 4000 rpm. Em tubos MARSXpress foram pesadas cinco alíquotas de 200 mg da mistura obtida aos quais foram adicionados 200 µL de peróxido de hidrogênio 30 % vv<sup>-1</sup> e 2,8 mL de solução de ácido nítrico 22 % v v<sup>-1</sup> destilado. Os tubos foram devidamente fechados e em seguida levados ao micro-ondas para digestão. Após completa digestão e resfriamento, o digerido foi transferido para um tubo Corning de 15 ml, avolumado com água 18,2 MΩ.cm até 9 mL e homogeneizado. Ao final do procedimento, todas as alíquotas resultantes foram transferidas para um frasco que foi armazenado em geladeira (4°C) até o momento do uso. Essa solução foi utilizada no preparo da curva de calibração dos estudos de linearidade, seletividade e efeito de matriz, precisão e recuperação.

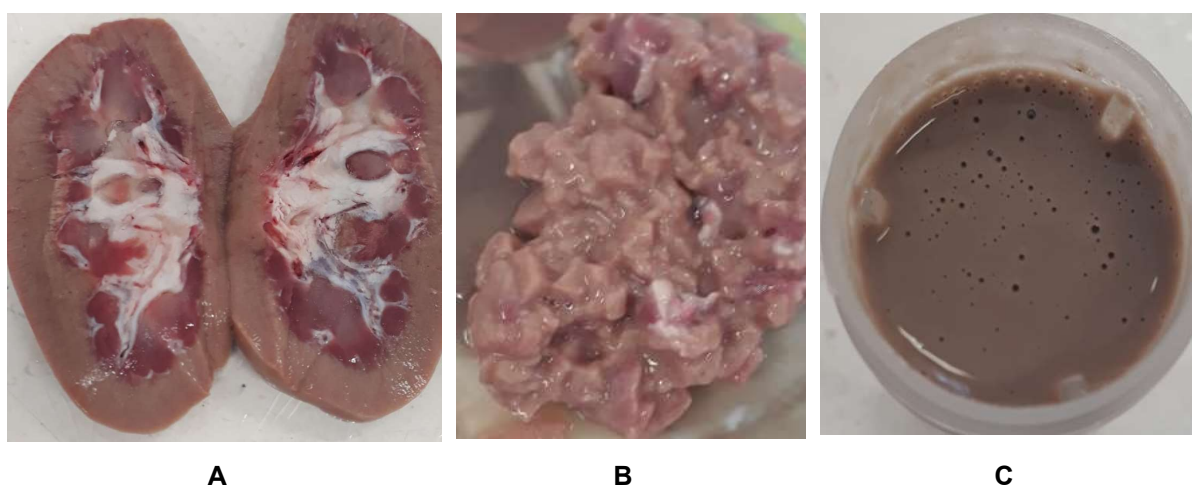


Figura 13 - Moagem rim suíno. (A) Lóbulos do rim. (B) rim cortado (C) rim suíno processado no Ultra Turrax Tube Drive®.

(Fonte: Autor)

#### 4.3.5.2 Preparo da matriz branca de sangue bovino

Inicialmente a amostra de sangue bovino hemolisado foi homogeneizada em um vórtex KASVI Basic K45-2810 a uma velocidade de 2800 rpm por 5 min. Em seguida, a amostra foi centrifugada em centrífuga Hettich Universal 320 por 20

minutos. Ao final do processo, o sobrenadante foi retirado e apenas o coágulo do sangue separado foi utilizado no preparo do digerido da matriz branca. Assim, seguiu-se à adição 2 g de solução de ácido nítrico 22% v v<sup>-1</sup> a uma alíquota de 4 g da amostra de sangue. Essa amostra foi processada no UltraTurrax® no tubo BMT-20 com adição de 10 esferas de vidro por 10 min a uma rotação de 4000 rpm. Em tubos MARSXpress foram pesadas cinco alíquotas de 200 mg da mistura obtida aos quais foram adicionados 200 µL de peróxido de hidrogênio 30 % v v<sup>-1</sup> e 2,8 mL de solução de ácido nítrico 22 % v v<sup>-1</sup> destilado. Os tubos foram devidamente fechados e em seguida levados ao micro-ondas para digestão. Após completa digestão e resfriamento, o digerido foi transferido para um tubo Corning de 15 mL, avolumado com água 18,2 MΩ.cm até 9 mL e homogeneizado. Ao final do procedimento, todas as alíquotas resultantes foram transferidas para um frasco que foi armazenado em geladeira (4°C) até o momento do uso. Essa solução foi utilizada no preparo da curva de calibração dos estudos de linearidade, seletividade e efeito de matriz, precisão e recuperação.

#### 4.3.5.3 Linearidade

Para avaliação da linearidade de cada uma das novas matrizes, cinco níveis da curva de calibração foram preparados em triplicatas independentes. As soluções foram preparadas pela adição de 3750 µL da matriz, 50 µL de uma solução de padrão interno contendo 250 µg L<sup>-1</sup> de índio, irídio e bismuto; 500 µg L<sup>-1</sup> de germânio e 2000 µg L<sup>-1</sup> de ródio e 20 µL, 60 µL, 100 µL, 140 µL e 180 µL de três soluções intermediárias distintas contendo os analitos vanádio, cromo, cobalto, arsênio, cádmio, antimônio, bário, mercúrio, chumbo, urânio, lantânio, cério, praseodímio, neodímio, samário, európio, térbio, gadolínio, disprósio, hólmio, érbio, túlio, itérbio e lutécio com uma concentração igual a 125 µg L<sup>-1</sup>, molibdênio com concentração igual a 750 µg L<sup>-1</sup>, alumínio e manganês 2500 µg L<sup>-1</sup> e 50 µL de uma solução de padrão interno contendo 250 µg L<sup>-1</sup> de índio, irídio e bismuto; 500 µg L<sup>-1</sup> de germânio e 2000 µg L<sup>-1</sup> de ródio. Em seguida o volume foi completado até 5 mL com água 18,2 MΩ.cm. Para a determinação dos elementos cobre, ferro e zinco foram preparadas curvas de calibração independentes em triplicata, nas quais foram adicionados 75 µL do extrato digerido da matriz branca 20 µL, 60 µL, 100 µL, 140 µL e 180 µL de cada solução intermediária preparada, em triplicata, contendo 750 µg L<sup>-1</sup> de ferro e zinco e 2500 µg L<sup>-1</sup> de cobre. Em cada um dos tubos foi adicionado 50 µL de uma solução de padrão

interno contendo 2000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de escândio e 5000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de gálio, 625  $\mu\text{L}$  da solução de ácido nítrico 40 % v v<sup>-1</sup> e o volume foi completado até 5 mL com água 18,2 M $\Omega$ .cm.

As soluções assim preparadas foram lidas em duplicata, inclusive as soluções de mesma concentração, e em ordem aleatória. Entre cada leitura foi utilizada uma solução de HNO<sub>3</sub> 5% v v<sup>-1</sup> para limpeza do sistema de introdução de amostras como cuidado para evitar contaminação cruzada. Com os dados obtidos prosseguiu-se o cálculo para definição da equação de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ponderados relativo, por meio do qual foram feitas as estimativas da interseção,  $a_w$ , e inclinação,  $b_w$ , as variâncias do intercepto e inclinação,  $S_{a,w}^2$  e  $S_{b,w}^2$ , respectivamente, além da covariância entre eles,  $\text{cov}(a_w, b_w)$ . Também foi feito estimado o coeficiente de correlação,  $r_w$ , e a estatística,  $t_{rw}$  para a regressão da curva de calibração e o coeficiente de determinação,  $R^2$ . Para verificação de *outliers*, homoscedasticidade, independência e normalidade na distribuição dos resíduos foram utilizados os testes de Dixon, Levene, Durbin-Watson e Anderson-Darling, respectivamente, além do teste de quantidade de resíduos.

#### 4.3.5.4 Seletividade e efeito de matriz

A curva de calibração em matriz branca de fígado bovino foi preparada em triplicata, a partir de soluções intermediárias independentes, seguindo os mesmos procedimentos descritos nas etapas da validação. As soluções assim preparadas foram lidas em duplicata, inclusive as soluções de mesma concentração, e em ordem aleatória. Entre cada leitura foi utilizada uma solução de HNO<sub>3</sub> 5% v v<sup>-1</sup> para limpeza do sistema de introdução de amostras como cuidado para evitar contaminação cruzada. Com os dados obtidos, foram feitas as estimativas da interseção,  $a_w$ , e inclinação,  $b_w$ , as variâncias do intercepto e inclinação,  $S_{a,w}^2$  e  $S_{b,w}^2$ , respectivamente, além da covariância entre eles,  $\text{cov}(a_w, b_w)$ , coeficiente de correlação,  $r_w$ , e a estatística,  $t_{rw}$  para a regressão da curva de calibração e o coeficiente de determinação,  $R^2$ . Para verificação de *outliers*, homoscedasticidade, independência e normalidade na distribuição dos resíduos foram utilizados os testes de Dixon, Levene, Durbin-Watson e Anderson-Darling, respectivamente, além do teste de quantidade de resíduos.

As comparações dos interceptos e inclinações das curvas em cada uma das novas matrizes e em digerido de matriz branca de fígado bovino foram feitas para

averiguar a existência do efeito de matriz a partir do teste t de Student para verificar a igualdade estatística dos interceptos  $a_1$  e  $a_2$  e das inclinações  $b_1$  e  $b_2$ , aplicando-se o teste F para verificar se as variâncias dos interceptos da curva de calibração em digerido de matriz branca de fígado bovino e de cada uma das outras matrizes são estatisticamente iguais por meio das equações 33 a 37. Os critérios de aceitação foram os mesmos outrora estabelecidos.

#### **4.3.5.5 Precisão: repetitividade**

A curva de calibração em matriz branca de fígado bovino foi preparada em triplicata, a partir de soluções intermediárias independentes, seguindo os mesmos procedimentos descritos nas etapas da validação. As soluções assim preparadas foram lidas em duplicata, inclusive as soluções de mesma concentração, e em ordem aleatória. Entre cada leitura foi utilizada uma solução de  $\text{HNO}_3$  5% v v<sup>-1</sup> para limpeza do sistema de introdução de amostras como cuidado para evitar contaminação cruzada. Com os dados obtidos, foram feitas as estimativas da interseção,  $a_w$ , e inclinação,  $b_w$ , as variâncias do intercepto e inclinação,  $S_{a,w}^2$  e  $S_{b,w}^2$ , respectivamente, além da covariância entre eles,  $\text{cov}(a_w, b_w)$ , coeficiente de correlação,  $r_w$ , e a estatística,  $t_{rw}$  para a regressão da curva de calibração e o coeficiente de determinação,  $R^2$ .

#### **4.3.5.6 Veracidade: recuperação**

A recuperação do método foi estudada por meio da análise de seis réplicas de cada nova matriz branca antes e depois da fortificação no nível baixo e intermediário. A curva de calibração foi feita em triplicata usando a matriz branca de fígado digerido. Com os dados obtidos na leitura, o fator de recuperação,  $f_{\text{rec}}$ , para cada analito foi determinado pela equação 45.

A veracidade do procedimento analítico deve estar compreendida ao redor de 100%, de acordo com as respectivas faixas de concentrações assim como apresentado na Tabela 7.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Otimização da moagem Ultra Turrax ®

O tubo BMT-20 foi escolhido por viabilizar uma diluição menor da amostra quando comparado à melhor condição obtida nos testes com o tubo DT-20. Os parâmetros dos testes 15 e 17 (Tabela 11) foram escolhidos para testar adição de solução ácida para substituir o uso de água no processo de moagem na tentativa de melhorar a eficiência da moagem. O resultado obtido na alíquota processada com ácido nítrico 22 % v v<sup>-1</sup> foi escolhido porque foi eficiente na eliminação da película que envolve o fígado e por ser a concentração ácida mais baixa que a outra testada.

As Tabelas 10 e 11 abaixo resumem os parâmetros estudados e os resultados preliminares obtidos em cada teste, de 1 a 19.

Tabela 10 - Estudo de homogeneização no tubo DT-20

Teste	Amostra	Massa de amostra (g)	Massa de água (g)	Rotação (rpm)	Tempo (min)	Resultado
1	FS	5	1	4000	2	Quantidade da mistura água e amostra insuficiente para alcançar o rotor do tubo.
2	FS	5	2	4000	5	
3	FS	5	3	4000	5	
4	FS	5	5	4000	5	Homogeneização ineficiente. Restaram pedaços da amostra sem moer.
5	FS	5	10	4000	5	
6	FS	10	5	4000	15	
7	FS	12	3	4000	20	
8	FS	7	8	4000	15	
9	FS	5	5	4000	10	
10	FS	5	10	4000	10	Homogeneização completa.
11	FB	5	10	4000	10	Homogeneização ineficiente, restaram pedaços de amostra sem moer.
12	FB	5	5	4000	10	

(Fonte: Autor)

Tabela 11 - Estudo de homogeneização no tubo BMT-20

Teste	Amostra	Massa de amostra (g)	Massa de água (g)	Rotação (rpm)	Tempo (min)	Resultado
13	FB	3	0	4000	10	Moagem ineficiente. Película e pedaços da amostra não moeram.
14	FB	4	2	4000	5	
15	FB	4	2	4000	10	
16	FB	2	2	4000	5	
17	FS	4	2	4000	10	
18	FG	5	2	4000	5	Homogeneização mais eficiente.
19	FG	4	0	4000	5	

(Fonte: Autor)

Depois de realizados testes variando tipo de tubo, massa de amostra, tempo de processamento e quantidade e acidez da solução de ácido nítrico, concluiu-se que os melhores resultados para homogeneização da amostra de fígado bovino foram obtidos a partir da utilização de 4 g de amostra de fígado, 2 g de ácido nítrico 22 %v/v<sup>1</sup> seguidos da homogeneização em tubo BMT-20 com 10 esferas de vidro por 10 min com rotação de 4000 rpm.

## 5.2 Otimização dos parâmetros ácidos de digestão

Três faixas de concentração ácida foram estudadas por meio de um teste de fortificação com Al, As, Ba, Cd, V, Cr, Hg, U, Ni, Pb, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Sm, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu, Co e Mo. Após a leitura, as concentrações desses analitos foram calculadas a partir da resposta instrumental normalizada pelos padrões internos <sup>69</sup>Ga, <sup>115</sup>In e <sup>193</sup>Ir. Os dados foram tratados considerando uma faixa de recuperação entre 80% e 120 % em relação à diferença entre as concentrações das amostras fortificadas, amostras brancas e branco analítico. Todos os resultados obtidos nos três níveis de adição reagentes ficaram dentro da faixa de recuperação de 80% a 120 %, exceto Al, Cr e Co em algumas faixas de concentração ácida estudadas, conforme apresentado na Tabela 12.

Tabela 12 - Recuperação teste de fortificação (%)

Reagentes (%)	<sup>27</sup> Al	<sup>51</sup> V	<sup>52</sup> Cr	<sup>59</sup> Co	<sup>60</sup> Ni	<sup>75</sup> As	<sup>95</sup> Mo	<sup>114</sup> Cd	<sup>121</sup> Sb	<sup>138</sup> Ba	<sup>201</sup> Hg	<sup>206</sup> Pb	<sup>238</sup> U
<b>HNO<sub>3</sub>: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>													
<b>4: 1,3</b>	105	89	87	90	91	90	94	96	98	94	100	96	91
<b>6: 2,0</b>	-12	81	78	78	81	82	81	85	88	83	91	85	81
<b>8: 2,6</b>	20	81	90	80	83	84	84	85	88	84	90	87	82

Reagentes (%)	<sup>139</sup> La	<sup>140</sup> Ce	<sup>141</sup> Pr	<sup>146</sup> Nd	<sup>147</sup> Sm	<sup>153</sup> Eu	<sup>159</sup> Tb	<sup>160</sup> Gd	<sup>163</sup> Dy	<sup>165</sup> Ho	<sup>166</sup> Er	<sup>169</sup> Tm	<sup>172</sup> Yb	<sup>175</sup> Lu
<b>4: 1,3</b>	94	97	98	96	97	99	100	100	98	94	98	92	97	95
<b>6: 2,0</b>	84	88	87	86	89	91	92	92	91	86	89	83	88	85
<b>8: 2,6</b>	86	88	87	86	90	93	93	93	91	88	91	85	90	85

(Fonte: Autor)

O resultado muito baixo para alumínio nos testes com HNO<sub>3</sub> 4 e 6% indicam contaminação no tubo do branco.

As alíquotas obtidas na digestão foram analisadas no ICPOES para avaliação do teor de carbono dissolvido. Os resultados para as três faixas de concentração ácida estudadas estão apresentados na Figura 14 abaixo:

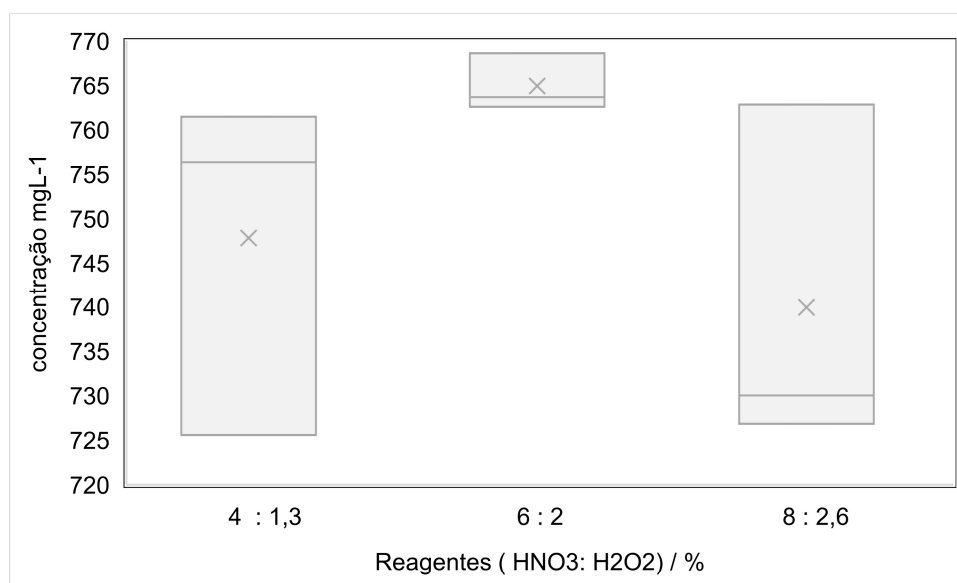


Figura 14 - Determinação de carbono orgânico total

(Fonte: Autor)

Com base nos resultados obtidos no teste de fortificação e determinação de carbono orgânico total, foi escolhida a primeira faixa de concentração ácida para fazer a digestão das amostras; 600 µL de ácido nítrico 65 % vv<sup>-1</sup> destilado, 200 µL peróxido de hidrogênio 30 % vv<sup>-1</sup> e 1500 µL de água 18,2 MΩ.cm. Com o objetivo de melhorar a rotina analítica e minimizar erros e contaminação, uma solução de ácido nítrico 22 % vv<sup>-1</sup> foi preparada para substituir os volumes separados de adição de água e ácido nítrico 65 % vv<sup>-1</sup> e passou-se a utilizar um volume de 2,8 mL de solução de ácido nítrico 22 % vv<sup>-1</sup>.

### 5.3 Linearidade

Com os dados obtidos das leituras da curva analítica em meio ácido, prosseguiu-se o cálculo para definição da equação de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ponderados relativo, MMQPR. A estimativa da interseção,  $a_w$ ,

inclinação,  $b_w$ , fator de correlação linear,  $r_w$ , e coeficiente de determinação,  $r_w^2$ , foram estimados para cada um dos analitos. Os resultados estão descritos na Tabela 13:

Tabela 13 - Equação de regressão linear e coeficiente de correlação linear da curva em meio ácido nítrico 5%  $v/v^{-1}$

<b>Analito</b>	<b>Curva de calibração (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b>Equação</b>	<b><math>r_w^2</math></b>
27 Al	10 – 90	$y=0,0035x-0,0018$	0,977
51 V	0,5 – 4,5	$y= 0,6603x - 0,0005$	0,998
52 Cr	0,5 – 4,5	$y=0,9041x - 0,0072$	0,995
55 Mn	10 – 90	$y=0,094x + 0,0612$	0,997
56 Fe	3 – 27	$y=0,1662x - 0,0256$	0,996
59 Co	0,5 – 4,5	$y=0,2775x + 0,0367$	0,991
60 Ni	0,5 – 4,5	$y=0,0794x + 0,0004$	0,993
63 Cu	10 – 90	$y=0,2528x + 0,0593$	0,996
66 Zn	3 – 27	$y= 0,0103x - 0,0005$	0,996
75 As	0,5 – 4,5	$y=0,0199x + 0,0008$	0,989
95 Mo	3 – 27	$y=0,0066x + 0,0005$	1,000
114 Cd	0,5 – 4,5	$y=0,131x + 0,0046$	1,000
121 Sb	0,5 – 4,5	$y=0,1404x + 0,0071$	0,999
138 Ba	0,5 – 4,5	$y=0,305x - 0,0309$	0,998
139 La	0,5 – 4,5	$y=0,2509x + 0,0057$	0,998
140 Ce	0,5 – 4,5	$y=0,3036x + 0,0147$	0,995
141 Pr	0,5 – 4,5	$y=0,2985x + 0,0075$	0,996
146 Nd	0,5 – 4,5	$y=0,0599x + 0,0016$	0,999
147 Sm	0,5 – 4,5	$y=0,053x - 0,0003$	0,997
153 Eu	0,5 – 4,5	$y=0,2082x + 0,0002$	0,999
160 Gd	0,5 – 4,5	$y=0,1373x + 0,0043$	0,999
159 Tb	0,5 – 4,5	$y=0,4995x + 0,0067$	0,998
163 Dy	0,5 – 4,5	$y=0,1216x + 0,0052$	0,997
165 Ho	0,5 – 4,5	$y=0,5058x + 0,0071$	0,999
166 Er	0,5 – 4,5	$y=0,1785x + 0,0012$	0,998
169 Tm	0,5 – 4,5	$y=0,5609x - 0,0004$	0,998
172 Yb	0,5 – 4,5	$y=0,1306x + 0,0014$	0,999
175 Lu	0,5 – 4,5	$y=0,3546x + 0,0108$	0,998
201 Hg	0,5 – 4,5	$y=0,0118x - 0,0041$	0,985
206 Pb	0,5 – 4,5	$y=0,1048x + 0,002$	1,000
238 U	0,5 – 4,5	$y=0,4981x + 0,0036$	0,999

(Fonte: Autor)

Como pode se observar pela Tabela 13, o ajuste linear foi adequado para todos os elementos determinados, com coeficientes de determinação ( $r_w^2$ ) variando de 0,977 a 1,000. Apenas alumínio, cobalto, níquel, arsênio e mercúrio apresentaram um  $r_w^2$  menor que 0,995, entretanto as curvas apresentam linearidade adequada de acordo com os testes estatísticos aplicados. Os resíduos da curva de calibração atenderam a todas as premissas avaliadas nos testes de Levene, Durbin-Watson e Anderson-Darling, ou seja, seguem a distribuição normal, são independentes e homocedásticos.

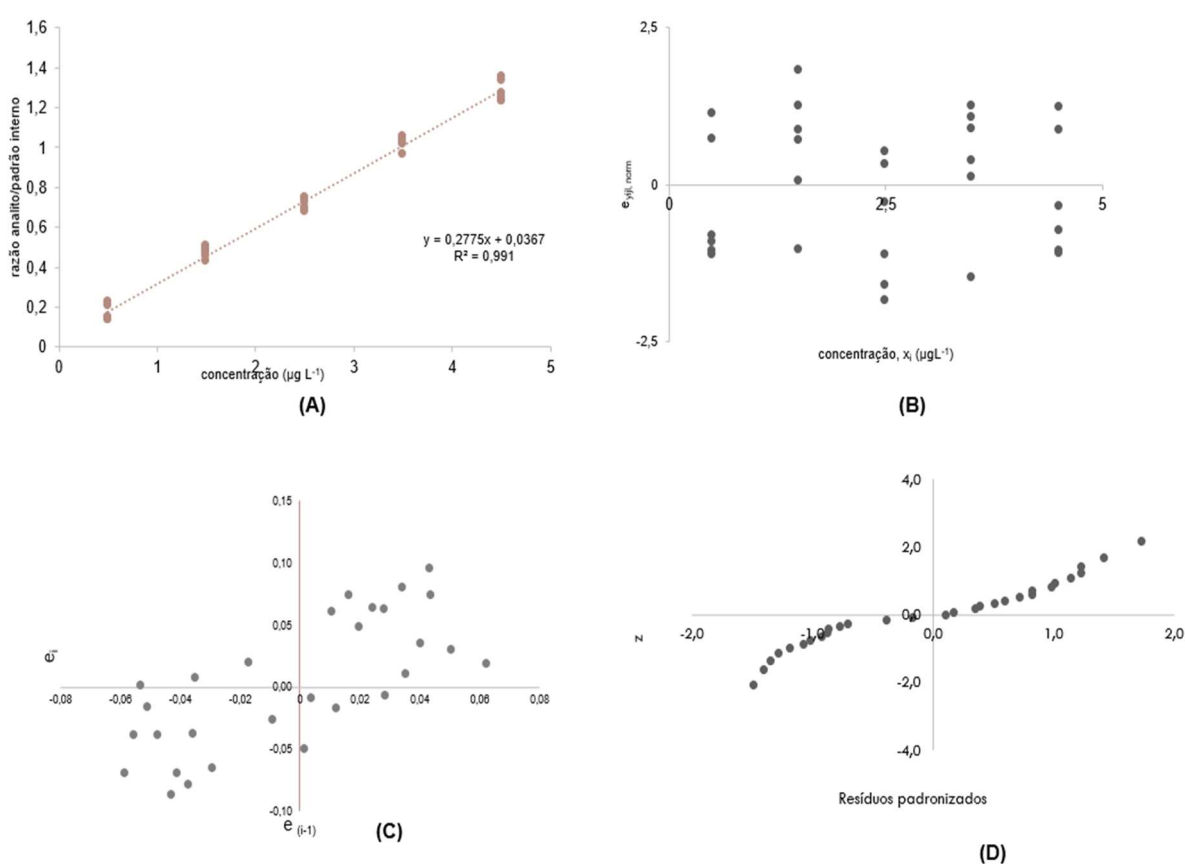


Figura 15 - (A) resposta instrumental vs concentração (B) Anderson-Darling: distribuição aleatória dos resíduos homoscedásticos (C) Durbin-Watson: Independência de resíduos (D) Levene: Normalidade dos resíduos do  $^{59}\text{Co}$ .

(Fonte: Autor)

#### 5.4 Seletividade e efeito de matriz

Com os dados obtidos das leituras da curva analítica em digerido da matriz branca de fígado, prosseguiu-se o cálculo para definição da equação de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ponderados relativo, MMQPR. A estimativa da interseção,  $a_w$ , inclinação,  $b_w$ , fator de correlação linear,  $r_w$ , e coeficiente de determinação,  $r_w^2$ , foram estimados para cada um dos analitos. Os resultados estão descritos na Tabela 14:

Tabela 14 - Equação de regressão linear e coeficiente de correlação linear da curva em meio digerido de amostra branca

(continua)

Analito	Curva de calibração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Equação	$r_w^2$
<sup>27</sup> Al	10 – 90	$Y=0,0034x + 0,0047$	0,971
<sup>51</sup> V	0,5 – 4,5	$y= 0,6616x + 0,0057$	0,998
<sup>52</sup> Cr	0,5 – 4,5	$y= 0,8488x + 0,0901$	0,994
<sup>55</sup> Mn	10 – 90	$y= 0,0919x + 0,0436$	0,997
<sup>56</sup> Fe	3 – 27	$y= 0,1878x + 0,055$	0,983
<sup>59</sup> Co	0,5 – 4,5	$y= 0,2954x + 0,0169$	0,996
<sup>60</sup> Ni	0,5 – 4,5	$y= 0,0839x + 0,0025$	0,995
<sup>63</sup> Cu	10 – 90	$y= 0,3164x + 0,5221$	0,991
<sup>66</sup> Zn	3 – 27	$y= 0,012x - 0,0015$	0,990
<sup>75</sup> As	0,5 – 4,5	$y=0,0218x - 0,0009$	0,995
<sup>95</sup> Mo	3 – 27	$y= 0,0063x + 0,001$	0,996
<sup>114</sup> Cd	0,5 – 4,5	$y= 0,1385x + 0,0025$	0,996
<sup>121</sup> Sb	0,5 – 4,5	$y= 0,1473x - 0,0047$	0,997
<sup>138</sup> Ba	0,5 – 4,5	$y= 0,3069x + 0,0129$	0,996
<sup>139</sup> La	0,5 – 4,5	$y= 0,2434x + 0,0047$	0,999
<sup>140</sup> Ce	0,5 – 4,5	$y = 0,2955x + 0,0117$	0,998
<sup>141</sup> Pr	0,5 – 4,5	$y= 0,2985x + 1E-05$	0,999
<sup>146</sup> Nd	0,5 – 4,5	$y= 0,0595x + 0,0004$	0,996
<sup>147</sup> Sm	0,5 – 4,5	$y= 0,0514x + 0,0013$	0,998
<sup>153</sup> Eu	0,5 – 4,5	$y= 0,2046x + 0,0011$	0,998
<sup>159</sup> Tb	0,5 – 4,5	$y= 0,4936x + 0,0103$	0,999
<sup>160</sup> Gd	0,5 – 4,5	$y=0,1363x + 0,0049$	0,999
<sup>163</sup> Dy	0,5 – 4,5	$y= 0,1215x + 0,0002$	0,999
<sup>165</sup> Ho	0,5 – 4,5	$y= 0,4968x + 0,0045$	0,999

<sup>166</sup> Er	0,5 – 4,5	$y = 0,1721x + 0,0028$	0,999
<sup>169</sup> Tm	0,5 – 4,5	$y = 0,5384x + 0,0129$	0,999
<sup>172</sup> Yb	0,5 – 4,5	$y = 0,1279x + 0,0021$	0,998
<sup>175</sup> Lu	0,5 – 4,5	$y = 0,3377x + 0,0069$	0,999
<sup>201</sup> Hg	0,5 – 4,5	$y = 0,0141x - 0,0025$	0,994
<sup>206</sup> Pb	0,5 – 4,5	$y = 0,1044x + 0,0093$	0,999
<sup>238</sup> U	0,5 – 4,5	$y = 0,5135x + 0,0024$	1,000

(Fonte: Autor)

O ajuste linear foi adequado para todos os elementos determinados, com coeficientes de determinação ( $r_w^2$ ) variando de 0,971 a 1,000. Apenas alumínio, cromo, ferro, cobre, zinco e mercúrio apresentaram um  $r_w^2$  menor que 0,995, entretanto as curvas apresentam linearidade adequada de acordo com os testes estatísticos aplicados. Os resíduos da curva de calibração atenderam a todas as premissas avaliadas nos testes de Levene, Durbin-Watson e Anderson-Darling, ou seja, seguem a distribuição normal, são independentes e homoscedásticos.

No teste de seletividade todos os elementos apresentaram efeito de matriz com exceção do vanádio, térbio e gadolínio, portanto, deve-se utilizar a curva em digerido de matriz branca para avaliação dos próximos parâmetros da validação, a saber, limite de detecção e quantificação, precisão, veracidade e robustez.

### 5.5 Limite de detecção e quantificação

De acordo com o Manual da Garantia de Qualidade do MAPA (BRASIL, 2011) os limites de detecção e quantificação devem ser estimados com 21 brancos e, posteriormente, deve ser confirmado com 7 amostras brancas fortificadas com os valores estimados ou valores próximos. Os valores de LD e LQ estimados e de LQ da técnica e do método (obtido multiplicando-se o LQ da técnica por 90, que é o fator de diluição utilizado no preparo da amostra) são apresentados na Tabela 15. Para cobre, ferro e zinco, os valores de LD e LQ do método foram obtidos multiplicando-se os LD's e LQ's da técnica por 4500, pois para esses elementos as amostras tiveram uma diluição adicional de 50 vezes. O LD e LQ do método foram estimados conforme equação 39 e 40, respectivamente. O LD estimado foi determinado como sendo 1/3 do menor ponto da curva analítica e o LQ da técnica estimado como sendo igual ao menor ponto da curva analítica.

Fez-se uma fortificação da matriz de concentração igual ao primeiro nível da curva para cada elemento, ou seja, 0,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  para vanádio, cromo, cobalto, níquel, arsênio, cádmio, antimônio, bário, mercúrio, chumbo, urânio e terras raras, 3  $\mu\text{g/L}$  para molibdênio, 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  para alumínio e manganês, 150  $\mu\text{g L}^{-1}$  para ferro e zinco e 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  para cobre. Para ser aceito como limite de quantificação, a análise das amostras fortificadas nessas concentrações deve apresentar recuperação aceitável, nas faixas de 50 a 120% e 80 a 110% para fortificações na faixa de 0,5 e acima de 10  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. Todos os elementos tiveram seus limites de quantificação confirmados no nível mais baixo das suas respectivas curvas. Os limites de detecção do método variaram de 0,014 a 4,05 mg/kg e os limites quantificação do método variaram de 0,045 a 45 mg/kg.

Tabela 15 - Parâmetros obtidos na avaliação dos limites de detecção e quantificação

(continua)

<b>Analito</b>	<b>LD estimado (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b>LD método (<math>\text{mg kg}^{-1}</math>)</b>	<b>LQ estimado (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b>LQ técnica (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b>LQ método (<math>\text{mg kg}^{-1}</math>)</b>
<sup>27</sup> Al	3,00	0,270	10,0	10,0	0,900
<sup>51</sup> V	0,15	0,014	0,279	0,5	0,045
<sup>52</sup> Cr	0,15	0,014	0,423	0,5	0,045
<sup>55</sup> Mn	3,00	0,270	17,6	10	0,900
<sup>56</sup> Fe	0,90	4,050	8,15	3	13,5
<sup>59</sup> Co	0,15	0,014	0,491	0,5	0,045
<sup>60</sup> Ni	0,15	0,014	0,617	0,5	0,045
<sup>63</sup> Cu	3,00	0,270	29,3	10	45,0
<sup>66</sup> Zn	0,90	4,050	16,1	3	13,5
<sup>75</sup> As	0,15	0,014	0,287	0,5	0,045
<sup>95</sup> Mo	0,90	0,081	1,50	3	0,270
<sup>114</sup> Cd	0,15	0,014	0,309	0,5	0,045
<sup>121</sup> Sb	0,15	0,014	0,412	0,5	0,045
<sup>138</sup> Ba	0,15	0,014	0,299	0,5	0,045
<sup>139</sup> La	0,15	0,014	0,161	0,5	0,045
<sup>140</sup> Ce	0,15	0,014	0,203	0,5	0,045
<sup>141</sup> Pr	0,15	0,014	0,045	0,5	0,045
<sup>146</sup> Nd	0,15	0,014	0,214	0,5	0,045
<sup>147</sup> Sm	0,15	0,014	0,039	0,5	0,045
<sup>153</sup> Eu	0,15	0,014	0,009	0,5	0,045
<sup>159</sup> Tb	0,15	0,014	0,003	0,5	0,045

<sup>160</sup> Gd	0,15	0,014	0,027	0,5	0,045
<sup>163</sup> Dy	0,15	0,014	0,013	0,5	0,045
<sup>165</sup> Ho	0,15	0,014	0,004	0,5	0,045
<sup>166</sup> Er	0,15	0,014	0,014	0,5	0,045
<sup>169</sup> Tm	0,15	0,014	0,003	0,5	0,045
<sup>172</sup> Yb	0,15	0,014	0,007	0,5	0,045
<sup>175</sup> Lu	0,15	0,014	0,003	0,5	0,045
<sup>201</sup> Hg	0,15	0,014	1,42	0,5	0,045
<sup>206</sup> Pb	0,15	0,014	0,405	0,5	0,045
<sup>238</sup> U	0,15	0,014	0,012	0,5	0,045

(Fonte: Autor)

## 5.6 Precisão e recuperação

A precisão e exatidão do método foram avaliadas por estudos de adição e recuperação em amostras de fígado bovino, que foram posteriormente digeridas. A fortificação das amostras foi realizada em dois níveis de concentração, sendo essas equivalentes aos primeiro e terceiro ponto das curvas após diluição de 90 vezes das amostras para alumínio, vanádio, cromo, cobalto, manganês, níquel, arsênio, molibdênio, cádmio, antimônio, bário, mercúrio, chumbo, urânio e terras raras, e de 4500 vezes para ferro, cobre e zinco. Assim, as amostras digeridas de fígado deveriam apresentar após diluição teores de 0,5 e 2,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  de vanádio, cromo, cobalto, níquel, arsênio, cádmio, antimônio, bário, mercúrio, chumbo, urânio e terras raras; 3,0 e 15,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  para ferro, zinco e molibdênio e 10 e 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  para alumínio, manganês e cobre.

Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 16. Os coeficientes de variação (CV) nos estudos de repetitividade e precisão intermediária variaram de 0,4 a 23,8% e de 1,9 a 24,2%, respectivamente, sendo todos os valores considerados adequados de acordo com os critérios de aceitação estabelecidos pelo MAPA. (BRASIL, 2011). Os maiores CV foram observados para alumínio, manganês, ferro, cobre e zinco porque esses elementos estão em maiores concentrações na amostra branca sugerindo a escolha de uma faixa mais ampla de fortificação. No estudo de tendência, as recuperações variaram de 81,5 a 109,7%, estando de acordo com os critérios de aceitação que estabelecem que para concentrações abaixo de 1  $\mu\text{g/L}$  (50 a 120 %), entre 1 e 10  $\mu\text{g/L}$  (70 a 110%) e acima de 10  $\mu\text{g/L}$  (80 a 110%) para a maioria dos elementos.

Tabela 16 - Parâmetros obtidos na avaliação da repetitividade, precisão intermediária e exatidão

Analito	Repetitividade (CV,%) N = 6		Precisão Intermediária (CV,%) N = 12		Recuperação (%) N= 12	
	Nível baixo	Nível médio	Nível baixo	Nível médio	Nível baixo	Nível médio
<sup>27</sup> Al	18	7	22	8	99	104
<sup>51</sup> V	8	2	7	6	104	103
<sup>52</sup> Cr	9	6	11	5	92	104
<sup>55</sup> Mn	19	5	23	6	102	107
<sup>56</sup> Fe	24	5	24	16	90	106
<sup>59</sup> Co	12	2	9	6	100	102
<sup>60</sup> Ni	5	3	8	8	96	102
<sup>63</sup> Cu	15	4	17	4	95	109
<sup>66</sup> Zn	20	7	20	6	81	109
<sup>75</sup> As	9	4	7	5	109	105
<sup>95</sup> Mo	5	1	12	4	90	97
<sup>114</sup> Cd	8	2	10	2	108	103
<sup>121</sup> Sb	6	3	8	6	110	106
<sup>138</sup> Ba	11	4	13	5	88	98
<sup>139</sup> La	4	2	4	9	107	105
<sup>140</sup> Ce	11	2	13	19	99	106
<sup>141</sup> Pr	4	2	6	5	100	98
<sup>146</sup> Nd	6	1	10	7	98	98
<sup>147</sup> Sm	8	2	7	6	96	98
<sup>153</sup> Eu	4	1	5	5	97	98
<sup>159</sup> Tb	3	0,4	5	4	99	99
<sup>160</sup> Gd	4	1	5	3	98	100
<sup>163</sup> Dy	4	2	5	5	99	98
<sup>165</sup> Ho	3	1	5	3	99	99
<sup>166</sup> Er	3	2	5	6	100	100
<sup>169</sup> Tm	2	1	3	5	96	99
<sup>172</sup> Yb	3	2	6	5	99	99
<sup>175</sup> Lu	3	1	6	6	96	98
<sup>201</sup> Hg	5	3	8	2	106	109
<sup>206</sup> Pb	4	2	18	2	82	102
<sup>238</sup> U	3	1	3	2	98	101

(Fonte: Autor)

## 5.7 Robustez

O estudo de robustez foi realizado com pequenas variações em condições experimentais, considerando-se a implementação do método na rotina do laboratório. Os fatores e variações estudados foram apresentados na Tabela 8. Na Tabela abaixo estão apresentados os resultados obtidos no estudo de cada um dos fatores.

Tabela 17 - Resultado do estudo de robustez

<b>Fatores estudados</b>	<b>Elementos impactados</b>
Massa de amostra triturada	Mn, Co, Cu, Sb, Ba e Nd
Ácido nítrico da trituração	Co, Cu e Sb
Ácido nítrico digestão	Cu, As, Tb e Ho
Peróxido de hidrogênio	Al, Mn, Co, Zn, Mo, Sb, Nd, Sm e Tb
Massa de amostra digerida	Mn, Co, Cu e Zn
Lavagem dos tubos do micro-ondas	Mn e Co
Exaustão/ fluxo laminar	Mn, Mo, Cu e Yb

(Fonte: Autor)

Por se tratar de um método para análise multielementar, as condições restritivas para um elemento serão aplicadas a todos. Desta forma, conclui-se que para execução adequada, o preparo deve ser realizado atendendo todas as variáveis estudadas acima. Ou seja, a trituração da amostra deve ser realizada com 4,0g de amostra e 2,0 g de ácido nítrico 22% vv<sup>-1</sup>, enquanto a digestão com 200 mg de amostra triturada, 2,8 mL de ácido nítrico 22% vv<sup>-1</sup> e 0,2 mL de peróxido de hidrogênio 30 % vv<sup>-1</sup>, sendo a etapa de adição do ácido nítrico e peróxido de hidrogênio realizada dentro da capela de fluxo-laminar e deve-se se realizar a lavagem das paredes dos tubos de digestão para garantir uma transferência eficiente do digerido para o tubo Corning®.

## 5.8 Expansão de Escopo

Foi realizado o procedimento de expansão de escopo para sangue bovino, fígado de galinha, suíno e de peixe, rim bovino e suíno, musculatura e brânquias de peixe. Foram preparadas soluções brancas com fígado bovino e com cada uma das matrizes a partir das quais foram feitas as curvas de calibração e as respostas instrumentais dessas novas matrizes foram comparadas às obtidas na matriz de

fígado bovino para avaliação da linearidade e seletividade. Cada nova matriz foi processada em sextuplicatas, fortificada em nível alto e médio, digerida e analisada para avaliação da recuperação e precisão.

Os resultados dos testes de linearidade, seletividade, precisão intermediária e recuperação estão apresentados nas Tabelas 18 a 25.

Tabela 18 - Parâmetros obtidos na avaliação da linearidade, seletividade, precisão e recuperação em sangue bovino

Analito	Linearidade e seletividade				Repetitividade		Recuperação	
	Matriz sangue bovino	$r_w^2$	Matriz fígado bovino	$r_w^2$	%CV nível baixo	%CV nível médio	% nível baixo	% nível médio
<sup>27</sup> Al	$y = 0,0022x + 0,0015$	0,994	$y = 0,0022x + 0,0015$	0,970	15	5	<b>69</b>	89
<sup>51</sup> V	$y = 0,7424x + 0,0641$	0,997	$y = 0,7577x + 0,0168$	0,999	8	4	96	104
<sup>52</sup> Cr	$y = 1,0397x + 0,0713$	0,998	$y = 1,0261x - 0,0578$	0,996	4	5	110	108
<sup>55</sup> Mn	$y = 0,1016x + 0,106$	0,994	$y = 0,1006x + 0,0574$	0,997	4	2	104	104
<sup>56</sup> Fe	$y = 0,2242x - 0,5455$	0,932	$y = 0,2242x - 0,5455$	0,987	22	14	92	89
<sup>59</sup> Co	$y = 0,4393x + 0,0357$	0,999	$y = 0,4422x - 0,0535$	0,981	4	3	113	105
<sup>60</sup> Ni	$y = 0,1278x + 0,0021$	0,999	$y = 0,1213x + 0,0061$	0,997	15	5	104	106
<sup>63</sup> Cu	$y = 0,0846x + 0,0505$	0,998	$y = 0,0846x + 0,0505$	0,998	2	4	<b>111</b>	101
<sup>66</sup> Zn	$y = 0,014x + 0,0065$	0,977	$y = 0,0117x - 0,0325$	0,991	3	4	<b>-178</b>	103
<sup>75</sup> As	$y = 0,0311x - 0,0012$	0,995	$y = 0,0311x - 0,0012$	0,995	15	4	104	108
<sup>95</sup> Mo	$y = 0,0064x - 0,0004$	1,000	$y = 0,0064x - 0,0004$	0,997	5	2	91	99
<sup>114</sup> Cd	$y = 0,1688x + 0,0065$	0,998	$y = 0,1682x + 0,0009$	0,996	10	4	98	105
<sup>121</sup> Sb	$y = 0,204x + 0,0025$	0,997	$y = 0,2099x - 0,0173$	0,998	8	3	108	105
<sup>138</sup> Ba	$y = 0,3759x + 0,0264$	0,999	$y = 0,3759x + 0,0264$	0,997	6	2	108	105
<sup>139</sup> La	$y = 0,2045x + 0,0099$	1,000	$y = 0,2132x + 0,0043$	0,998	3	2	101	101
<sup>140</sup> Ce	$y = 0,2559x + 0,0026$	1,000	$y = 0,2559x + 0,0026$	0,999	3	1	101	101
<sup>141</sup> Pr	$y = 0,2258x + 0,0053$	1,000	$y = 0,2328x + 0,0063$	0,999	4	2	98	101
<sup>146</sup> Nd	$y = 0,0444x + 0,0007$	0,998	$y = 0,0446x + 0,0012$	1,000	6	3	92	97
<sup>147</sup> Sm	$y = 0,0388x + 5E-05$	1,000	$y = 0,0388x + 5E-05$	0,997	5	3	99	101
<sup>153</sup> Eu	$y = 0,1501x + 0,0044$	1,000	$y = 0,1553x + 0,0008$	0,998	2	2	102	101
<sup>159</sup> Tb	$y = 0,1082x + 0,0036$	0,999	$y = 0,1082x + 0,0036$	0,999	4	1	96	102
<sup>160</sup> Gd	$y = 0,3537x + 0,0138$	0,999	$y = 0,366x - 8E-05$	1,000	3	2	100	102
<sup>163</sup> Dy	$y = 0,0859x + 0,0046$	0,999	$y = 0,0859x + 0,0046$	0,999	4	2	105	100
<sup>165</sup> Ho	$y = 0,3702x + 0,0091$	0,999	$y = 0,3703x + 0,0034$	1,000	4	2	104	101
<sup>166</sup> Er	$y = 0,128x + 0,0046$	0,999	$y = 0,128x + 0,0046$	0,999	2	2	103	102
<sup>169</sup> Tm	$y = 0,4096x + 0,0098$	1,000	$y = 0,4097x + 0,0059$	0,999	3	1	99	101
<sup>172</sup> Yb	$y = 0,0934x + 0,0034$	1,000	$y = 0,0934x + 0,0034$	1,000	6	2	98	101
<sup>175</sup> Lu	$y = 0,2164x + 0,0056$	1,000	$y = 0,2249x + 0,0035$	0,995	3	2	99	101
<sup>201</sup> Hg	$y = 0,0138x - 0,0006$	0,997	$y = 0,0168x - 0,001$	0,990	6	3	76	82
<sup>206</sup> Pb	$y = 0,1279x - 0,0003$	0,999	$y = 0,1279x - 0,0003$	0,999	7	2	91	101
<sup>238</sup> U	$y = 0,2045x + 0,0099$	1,000	$y = 0,2045x + 0,0099$	1,000	3	1	102	102

(Fonte: Autor)

Os resultados do teste de seletividade apontaram efeito de matriz para todos os analitos, com exceção de bário e gadolínio. Entretanto, avaliando os coeficientes de variação e recuperação obtidos, considerou-se adequado incluir a matriz sangue bovino ao método, com restrições apenas para o nível mais baixo de alumínio, cobre e zinco.

Tabela 19 - Parâmetros obtidos na avaliação da linearidade, seletividade e precisão e recuperação em fígado de galinha

Analito	Linearidade e seletividade				Precisão		Recuperação	
	Matriz fígado galinha	$r_w^2$	Matriz fígado bovino	$r_w^2$	%CV nível baixo	%CV nível médio	% nível baixo	% nível médio
<sup>27</sup> Al	$y = 0,0044x + 0,0111$	0,985	$y = 0,0062x + 0,0288$	0,991	8	3	218	102
<sup>51</sup> V	$= 0,5812x + 0,0203$	0,997	$y = 0,8147x + 0,0311$	0,998	7	5	99	109
<sup>52</sup> Cr	$y = 0,6951x + 0,0134$	0,997	$y = 0,1294x - 0,0005$	0,988	7	3	87	106
<sup>55</sup> Mn	$y = 0,0799x + 0,0042$	0,997	$y = 0,1164x - 0,0296$	0,993	6	3	108	102
<sup>56</sup> Fe	$y = 0,0298x - 0,0364$	0,988	$y = 0,0261x + 0,0158$	0,984	21	7	92	99
<sup>59</sup> Co	$y = 0,349x + 0,005$	0,999	$y = 0,4477x - 0,006$	0,960	2	2	118	107
<sup>60</sup> Ni	$y = 0,0964x + 0,0004$	0,998	$y = 0,1152x + 0,0126$	0,972	6	5	99	110
<sup>63</sup> Cu	$y = 0,0486x + 0,0027$	0,999	$y = 0,0438x - 0,0594$	0,994	2	2	100	106
<sup>66</sup> Zn	$y = 0,0012x - 0,0006$	0,996	$y = 0,0011x - 1E-05$	0,989	9	2	90	103
<sup>75</sup> As	$y = 0,0235x - 3E-05$	0,994	$y = 0,0332x - 0,0006$	0,997	6	4	105	105
<sup>95</sup> Mo	$y = 0,0044x + 9E-05$	0,998	$= 0,0068x - 0,0002$	0,997	6	3	96	97
<sup>114</sup> Cd	$y = 0,1195x + 0,0058$	0,998	$y = 0,1576x + 0,0107$	0,987	3	3	96	109
<sup>121</sup> Sb	$y = 0,1235x + 0,0022$	0,997	$y = 0,1696x + 0,0062$	0,999	9	3	106	102
<sup>138</sup> Ba	$y = 0,2361x + 0,0051$	0,999	$y = 0,347x + 0,0079$	0,999	4	3	104	102
<sup>139</sup> La	$y = 0,2271x + 0,0078$	0,999	$y = 0,4161x + 0,0091$	0,968	3	3	85	87
<sup>140</sup> Ce	$y = 0,2738x + 0,0069$	1,000	$y = 0,485x + 0,0201$	0,977	5	4	87	90
<sup>141</sup> Pr	$y = 0,2366x + 0,0042$	0,999	$y = 0,4285x + 0,0023$	0,973	3	4	88	89
<sup>146</sup> Nd	$y = 0,0472x + 0,0009$	0,999	$y = 0,0871x - 0,0009$	0,985	4	3	87	89
<sup>147</sup> Sm	$y = 0,0407x + 0,0013$	0,998	$y = 0,0723x + 0,0003$	0,982	6	5	87	91
<sup>153</sup> Eu	$y = 0,1528x + 0,0012$	0,999	$y = 0,2693x + 0,0002$	0,981	4	5	86	92
<sup>159</sup> Tb	$y = 0,1081x - 0,0005$	0,999	$y = 0,1764x + 0,0043$	0,992	4	3	87	93
<sup>160</sup> Gd	$y = 0,365x + 0,0092$	0,998	$y = 0,6305x - 0,0004$	0,992	5	2	89	96
<sup>163</sup> Dy	$y = 0,0876x + 0,0019$	0,999	$y = 0,152x - 0,0021$	0,993	4	3	81	91
<sup>165</sup> Ho	$y = 0,3483x + 0,0042$	0,999	$y = 0,5882x + 0,0008$	0,988	2	2	91	93
<sup>166</sup> Er	$y = 0,1257x + 0,0009$	1,000	$y = 0,21x - 0,0034$	0,997	3	3	95	94
<sup>169</sup> Tm	$y = 0,3722x + 0,005$	0,999	$y = 0,6171x + 0,0017$	0,992	2	3	92	92
<sup>172</sup> Yb	$y = 0,0841x + 0,0019$	0,999	$y = 0,137x + 0,0046$	0,993	6	3	82	97
<sup>175</sup> Lu	$y = 0,1952x - 0,0004$	0,999	$y = 0,3435x + 4E-05$	0,977	4	3	86	91
<sup>201</sup> Hg	$y = 0,0095x - 0,0003$	0,988	$y = 0,0135x - 0,0012$	0,985	14	14	105	108
<sup>206</sup> Pb	$y = 0,084x - 0,0003$	0,999	$y = 0,1221x + 0,0085$	0,999	4	1	91	103
<sup>238</sup> U	$y = 0,4151x + 0,0093$	0,999	$y = 0,5891x + 0,0118$	0,999	2	2	100	105

(Fonte: Autor)

Os resultados do teste de seletividade apontaram efeito de matriz para todos os analitos. Entretanto, avaliando os coeficientes de variação e recuperação obtidos, considerou-se adequado incluir a matriz fígado de galinha ao método, com restrições apenas para o nível mais baixo de alumínio.

Tabela 20 - Parâmetros obtidos na avaliação da linearidade, seletividade e precisão e recuperação em fígado suíno

Analito	Linearidade e seletividade				Precisão		Recuperação	
	Matriz fígado suíno	$r_w^2$	Matriz fígado bovino	$r_w^2$	%CV nível baixo	%CV nível médio	% nível baixo	% nível médio
<sup>27</sup> Al	$y = 0,0069x + 0,0171$	0,997	$y = 0,0085x + 0,0164$	0,975	10	4	108	82
<sup>51</sup> V	$y = 0,7957x + 0,0355$	0,998	$y = 0,7542x + 0,0586$	0,996	5	3	99	104
<sup>52</sup> Cr	$y = 1,0044x + 0,0301$	0,998	$y = 0,928x + 0,0913$	0,995	4	6	107	109
<sup>55</sup> Mn	$y = 0,115x - 0,0402$	0,997	$y = 0,1049x + 0,0759$	0,998	8	4	100	100
<sup>56</sup> Fe	$y = 0,1561x + 0,1447$	0,963	$y = 0,152x - 0,0869$	0,989	33	14	109	102
<sup>59</sup> Co	$y = 0,4886x - 0,0054$	0,999	$y = 0,4292x - 0,032$	0,987	4	2	106	109
<sup>60</sup> Ni	$y = 0,1288x - 0,0012$	0,995	$y = 0,1129x - 0,0048$	0,990	6	3	112	110
<sup>63</sup> Cu	$y = 0,2753x + 0,1483$	0,998	$y = 0,259x + 0,2797$	0,941	5	2	108	116
<sup>66</sup> Zn	$y = 0,0119x + 0,001$	0,996	$y = 0,0112x - 0,0289$	0,980	22	4	93	110
<sup>75</sup> As	$y = 0,0347x - 0,0023$	0,996	$y = 0,0329x - 0,0005$	0,995	7	3	108	99
<sup>95</sup> Mo	$y = 0,0069x + 0,0005$	0,996	$y = 0,007x - 7E-05$	0,999	10	3	98	98
<sup>114</sup> Cd	$y = 0,1694x - 0,0024$	0,999	$y = 0,1535x - 0,0048$	0,993	10	3	96	109
<sup>121</sup> Sb	$y = 0,1853x - 0,0044$	0,998	$y = 0,172x + 0,0066$	0,997	5	3	98	101
<sup>138</sup> Ba	$y = 0,3762x - 0,0008$	0,998	$y = 0,3568x + 0,0155$	0,998	3	1	101	99
<sup>139</sup> La	$y = 0,3724x - 0,0059$	0,999	$y = 0,3993x + 0,0022$	0,989	2	1	94	84
<sup>140</sup> Ce	$y = 0,4211x + 0,0122$	0,997	$y = 0,4699x - 0,0047$	0,997	1	2	99	85
<sup>141</sup> Pr	$y = 0,3732x + 0,0071$	0,997	$y = 0,4175x + 0,0019$	0,997	1	2	93	84
<sup>146</sup> Nd	$y = 0,0752x + 0,0021$	0,996	$y = 0,0836x + 0,0006$	0,995	2	3	97	85
<sup>147</sup> Sm	$y = 0,0661x - 0,0003$	0,997	$y = 0,0735x - 0,0005$	0,998	4	5	75	81
<sup>153</sup> Eu	$y = 0,2387x + 0,0081$	0,998	$y = 0,2645x + 0,0089$	0,997	1	2	91	83
<sup>159</sup> Tb	$y = 0,1645x + 0,0033$	0,999	$y = 0,1794x - 0,004$	0,998	4	2	93	86
<sup>160</sup> Gd	$y = 0,5684x + 0,0157$	0,998	$y = 0,6306x - 0,0022$	0,998	3	2	83	84
<sup>163</sup> Dy	$y = 0,1387x + 0,0012$	0,999	$y = 0,1543x - 0,0005$	0,996	2	2	96	88
<sup>165</sup> Ho	$y = 0,5601x - 0,0034$	0,999	$y = 0,5904x + 0,012$	0,998	2	2	94	94
<sup>166</sup> Er	$y = 0,1929x + 0,0027$	0,999	$y = 0,2135x - 0,0025$	0,996	2	2	97	89
<sup>169</sup> Tm	$y = 0,5809x + 0,0173$	1,000	$y = 0,6204x + 0,0073$	0,997	3	1	81	87
<sup>172</sup> Yb	$y = 0,1364x + 0,0001$	0,999	$y = 0,1431x + 0,0019$	0,997	2	2	93	89
<sup>175</sup> Lu	$y = 0,3315x + 0,0022$	0,999	$y = 0,3687x + 0,0164$	0,996	1	1	90	84
<sup>201</sup> Hg	$y = 0,0159x - 0,0021$	0,990	$y = 0,0144x - 0,0035$	0,993	9	4	89	114
<sup>206</sup> Pb	$y = 0,1251x + 0,0022$	0,999	$y = 0,1251x + 0,0019$	0,998	14	2	91	126
<sup>238</sup> U	$y = 0,6189x - 0,0094$	0,998	$y = 0,6097x + 0,004$	0,999	2	1	104	98

(Fonte: Autor)

Os resultados do teste de seletividade apontaram efeito de matriz para todos os analitos, exceto para urânio. Entretanto, avaliando os coeficientes de variação e recuperação obtidos, considerou-se adequado incluir a matriz fígado suíno ao método, com restrições apenas para o nível mais baixo de ferro, pois apresentou coeficiente de variação acima do desejável.

Tabela 21 - Parâmetros obtidos na avaliação da linearidade, seletividade e precisão e recuperação em fígado de tilápia

(continua)

Analito	Linearidade e seletividade				Precisão		Recuperação	
	Matriz fígado tilápia	$r_w^2$	Matriz fígado bovino	$r_w^2$	%CV nível baixo	%CV nível médio	% nível baixo	% nível médio
<sup>27</sup> Al	$y = 0,0067x - 0,0149$	0,993	$y = 0,0062x + 0,0288$	0,991	19	6	<b>110</b>	103
<sup>51</sup> V	$y = 0,823x + 0,0662$	0,998	$y = 0,8147x + 0,0311$	0,998	7	3	98	105
<sup>52</sup> Cr	$y = 1,0041x + 0,0431$	0,997	$y = 0,1294x - 0,0005$	0,998	9	2	91	109
<sup>55</sup> Mn	$y = 0,1153x + 0,0225$	0,999	$y = 0,1164x - 0,0296$	0,993	4	4	96	97
<sup>56</sup> Fe	$y = 0,0281x + 0,0279$	0,995	$y = 0,0261x + 0,0158$	0,984	16	3	106	104
<sup>59</sup> Co	$y = 0,5168x - 0,0658$	0,989	$y = 0,4477x - 0,006$	0,960	21	6	113	100
<sup>60</sup> Ni	$y = 0,1408x - 0,0093$	0,996	$y = 0,1152x + 0,0126$	0,972	3	6	114	108
<sup>63</sup> Cu	$y = 0,0498x + 0,0569$	0,993	$y = 0,0438x - 0,0594$	0,944	13	10	106	103
<sup>66</sup> Zn	$y = 0,0011x - 8E-05$	0,997	$y = 0,0011x - 1E-05$	0,989	13	4	87	99
<sup>75</sup> As	$y = 0,0353x - 0,003$	0,997	$y = 0,0332x - 0,0006$	0,994	9	4	101	102
<sup>95</sup> Mo	$y = 0,0067x - 0,0004$	0,999	$y = 0,0068x - 0,0002$	0,997	5	2	94	96
<sup>114</sup> Cd	$y = 0,1766x + 0,0024$	0,998	$y = 0,1576x + 0,0107$	0,987	11	3	102	109
<sup>121</sup> Sb	$y = 0,1833x - 0,0045$	0,997	$y = 0,1696x + 0,0062$	0,999	13	5	106	101
<sup>138</sup> Ba	$y = 0,3498x + 0,0174$	0,997	$y = 0,3492x + 0,0126$	0,999	5	3	109	102
<sup>139</sup> La	$y = 0,3466x - 0,0049$	0,999	$y = 0,4161x + 0,0091$	0,968	5	1	90	90
<sup>140</sup> Ce	$y = 0,4102x + 0,0006$	0,999	$y = 0,485x + 0,0201$	0,977	4	1	87	92
<sup>141</sup> Pr	$y = 0,3537x + 0,0021$	1,000	$y = 0,4285x + 0,0023$	0,973	2	2	90	90
<sup>146</sup> Nd	$y = 0,0688x + 0,0028$	0,998	$y = 0,0871x - 0,0009$	0,985	5	3	89	90
<sup>147</sup> Sm	$y = 0,0596x + 0,0031$	0,998	$y = 0,0723x + 0,0003$	0,982	6	2	84	89
<sup>153</sup> Eu	$y = 0,2239x + 0,0059$	0,997	$y = 0,2693x + 0,0002$	0,981	3	2	91	89
<sup>159</sup> Tb	$y = 0,16x + 0,0041$	0,998	$y = 0,1764x + 0,0043$	0,992	5	2	92	93
<sup>160</sup> Gd	$y = 0,5477x - 0,0045$	0,997	$y = 0,6305x - 0,0004$	0,992	2	3	87	94
<sup>163</sup> Dy	$y = 0,1295x + 0,0041$	0,998	$y = 0,152x - 0,0021$	0,993	5	3	86	87
<sup>165</sup> Ho	$y = 0,5175x + 0,0136$	0,998	$y = 0,5882x + 0,0008$	0,988	2	2	92	89
<sup>166</sup> Er	$y = 0,1818x + 0,0077$	0,998	$y = 0,21x - 0,0034$	0,997	5	2	93	92
<sup>169</sup> Tm	$y = 0,5527x + 0,0079$	1,000	$y = 0,6171x + 0,0017$	0,992	2	1	92	89
<sup>172</sup> Yb	$y = 0,1233x + 0,0057$	0,999	$y = 0,137x + 0,0046$	0,993	2	3	81	94
<sup>175</sup> Lu	$y = 0,2851x + 0,0035$	0,999	$y = 0,3435x + 4E-05$	0,977	2	2	87	88
<sup>201</sup> Hg	$y = 0,0146x - 0,0013$	0,995	$y = 0,0135x - 0,0012$	0,998	13	9	98	104

<sup>206</sup> Pb	$y = 0,126x + 0,005$	0,996	$y = 0,1221x + 0,0085$	0,999	7	3	86	105
<sup>238</sup> U	$y = 0,6212x + 0,0086$	1,000	$y = 0,5891x + 0,0118$	0,968	4	2	105	105

(Fonte: Autor)

Os resultados do teste de seletividade apontaram efeito de matriz para todos os analitos, exceto para bário e zinco. Entretanto, avaliando os coeficientes de variação e recuperação obtidos, considerou-se adequado incluir a matriz fígado de peixe ao método.

Tabela 22 - Parâmetros obtidos na avaliação da linearidade, seletividade e precisão e recuperação em rim bovino

(continua)

Analito	Linearidade e seletividade				Precisão		Recuperação	
	Matriz rim bovino	$r_w^2$	Matriz fígado bovino	$r_w^2$	%CV nível baixo	%CV nível médio	% nível baixo	% nível médio
<sup>27</sup> Al	$y = 0,0018x + 0,0005$	0,999	$y = 0,0016x + 0,0052$	0,991	10	3	100	106
<sup>51</sup> V	$y = 0,8599x + 0,0206$	0,991	$y = 0,8147x + 0,0311$	0,998	7	3	102	107
<sup>52</sup> Cr	$y = 1,0307x - 0,0208$	0,995	$y = 0,1294x - 0,0005$	0,997	7	1	102	109
<sup>55</sup> Mn	$y = 0,1171x + 0,0229$	0,998	$y = 0,1164x - 0,0296$	0,993	5	2	99	101
<sup>56</sup> Fe	$y = 0,0277x + 0,0008$	0,997	$y = 0,0261x + 0,0158$	0,980	21	5	91	108
<sup>59</sup> Co	$y = 0,5076x - 0,0079$	0,997	$y = 0,4477x - 0,006$	0,960	5	1	96	105
<sup>60</sup> Ni	$y = 0,1394x + 0,0012$	0,997	$y = 0,1152x + 0,0126$	0,972	7	3	96	109
<sup>63</sup> Cu	$y = 0,0471x + 0,0116$	1,000	$y = 0,0438x - 0,0594$	0,944	3	2	92	104
<sup>66</sup> Zn	$y = 0,0011x + 0,0001$	0,998	$y = 0,0011x - 1E-05$	0,989	7	5	103	100
<sup>75</sup> As	$y = 0,0345x + 0,0009$	0,994	$y = 0,0332x - 0,0006$	0,996	4	7	96	107
<sup>95</sup> Mo	$y = 0,0066x - 0,0007$	0,999	$y = 0,0068x - 0,0002$	0,997	4	5	95	98
<sup>114</sup> Cd	$y = 0,1786x - 0,0013$	0,996	$y = 0,1576x + 0,0107$	0,987	7	5	106	107
<sup>121</sup> Sb	$y = 0,1837x + 0,0008$	0,996	$y = 0,1696x + 0,0062$	0,999	10	5	94	106
<sup>138</sup> Ba	$y = 0,3577x + 0,006$	0,997	$y = 0,347x + 0,0079$	0,999	22	4	101	103
<sup>139</sup> La	$y = 0,3648x - 0,0089$	0,997	$y = 0,4161x + 0,0091$	0,968	3	1	92	92
<sup>140</sup> Ce	$y = 0,4259x - 0,0136$	0,998	$y = 0,485x + 0,0201$	0,977	2	2	88	92
<sup>141</sup> Pr	$y = 0,3763x - 0,0131$	0,996	$y = 0,4285x + 0,0023$	0,973	4	2	92	93
<sup>146</sup> Nd	$y = 0,0763x - 0,0018$	0,999	$y = 0,0871x - 0,0009$	0,985	5	3	86	94
<sup>147</sup> Sm	$y = 0,0619x + 0,001$	0,996	$y = 0,0723x + 0,0003$	0,982	6	3	83	92
<sup>153</sup> Eu	$y = 0,242x - 0,0075$	0,997	$y = 0,2693x + 0,0002$	0,992	2	2	91	92
<sup>159</sup> Tb	$y = 0,1641x - 0,0004$	0,999	$y = 0,1764x + 0,0043$	0,992	3	2	93	96
<sup>160</sup> Gd	$y = 0,5664x - 0,0074$	0,997	$y = 0,6305x - 0,0004$	0,992	2	2	89	97

<sup>163</sup> Dy	$y = 0,1367x - 0,0042$	0,998	$y = 0,152x - 0,0021$	0,993	7	2	88	95
<sup>165</sup> Ho	$y = 0,5377x - 0,0105$	0,999	$y = 0,5882x + 0,0008$	0,988	4	2	94	96
<sup>166</sup> Er	$y = 0,1872x + 0,0016$	0,998	$y = 0,21x - 0,0034$	0,997	4	1	99	97
<sup>169</sup> Tm	$y = 0,576x - 0,0109$	0,999	$y = 0,6171x + 0,0017$	0,992	2	1	93	95
<sup>172</sup> Yb	$y = 0,1298x + 0,0005$	0,997	$y = 0,137x + 0,0046$	0,993	3	0,5	87	96
<sup>175</sup> Lu	$y = 0,3008x - 0,0061$	0,998	$y = 0,3435x + 4E-05$	0,977	2	2	93	92
<sup>201</sup> Hg	$y = 0,0136x - 0,0003$	0,986	$y = 0,0135x - 0,0012$	0,985	10	4	139	136
<sup>206</sup> Pb	$y = 0,1263x + 0,0007$	0,995	$y = 0,1221x + 0,0085$	0,999	14	4	93	104
<sup>238</sup> U	$y = 0,6167x - 0,0189$	0,998	$y = 0,5891x + 0,0118$	0,999	3	1	101	109

(Fonte: Autor)

Os resultados do teste de seletividade apontaram efeito de matriz para todos os analitos, exceto para arsênio e zinco. Entretanto, avaliando os coeficientes de variação e recuperação obtidos, considerou-se adequado incluir a matriz rim bovino ao método.

Tabela 23 - Parâmetros obtidos na avaliação da linearidade, seletividade e precisão e recuperação em rim suíno

(continua)

Analito	Linearidade e seletividade				Precisão		Recuperação	
	Matriz rim suíno	$r_w^2$	Matriz fígado bovino	$r_w^2$	%CV nível baixo	%CV nível médio	% nível baixo	% nível médio
<sup>27</sup> Al	$y = 0,003x + 0,0013$	0,993	$y = 0,0031x + 0,0016$	0,993	8	4	100	92
<sup>51</sup> V	$y = 0,761x + 0,0258$	0,997	$y = 0,7298x + 0,03$	0,998	8	4	102	106
<sup>52</sup> Cr	$y = 0,9375x + 0,0334$	0,996	$y = 0,9375x + 0,0334$	0,995	5	4	104	109
<sup>55</sup> Mn	$y = 0,1071x - 0,034$	0,998	$y = 0,1073x + 0,1084$	0,997	8	2	92	100
<sup>56</sup> Fe	$y = 0,1665x + 0,0442$	0,998	$y = 0,1681x - 0,0799$	0,981	18	3	108	114
<sup>59</sup> Co	$y = 0,0181x + 0,0097$	0,998	$y = 0,0181x + 0,0097$	0,987	7	3	108	108
<sup>60</sup> Ni	$y = 0,3625x + 0,0097$	0,998	$y = 0,0866x + 0,0044$	0,996	22	4	95	110
<sup>63</sup> Cu	$y = 0,3109x + 0,103$	1,000	$y = 0,3109x + 0,103$	0,956	5	3	71	97
<sup>66</sup> Zn	$y = 0,0129x + 0,0054$	0,999	$y = 0,0138x - 0,0021$	0,979	11	2	92	85
<sup>75</sup> As	$y = 0,0272x + 0,0003$	0,991	$y = 0,0288x - 0,0009$	0,996	5	3	117	102
<sup>95</sup> Mo	$y = 0,0068x - 0,0002$	0,999	$y = 0,007x + 0,0011$	0,999	14	3	97	100
<sup>114</sup> Cd	$y = 0,1533x - 0,0007$	0,999	$y = 0,1533x - 0,0007$	0,992	16	4	98	108
<sup>121</sup> Sb	$y = 0,1813x - 6E-05$	0,999	$y = 0,1758x + 0,0074$	0,998	18	3	92	104
<sup>138</sup> Ba	$y = 0,3717x - 0,0002$	0,999	$y = 0,3717x - 0,0002$	0,999	5	2	116	104
<sup>139</sup> La	$y = 0,3035x - 0,0022$	0,999	$y = 0,3035x - 0,0022$	0,997	3	2	92	91

<sup>140</sup> Ce	$y = 0,3623x + 0,0009$	0,999	$y = 0,3898x + 0,0296$	0,996	3	2	99	93
<sup>141</sup> Pr	$y = 0,3405x - 0,003$	0,999	$y = 0,373x + 0,0195$	0,990	3	2	89	89
<sup>146</sup> Nd	$y = 0,0663x - 0,0003$	0,998	$y = 0,0663x - 0,0003$	0,992	9	2	82	85
<sup>147</sup> Sm	$y = 0,0577x + 0,0001$	0,998	$y = 0,0577x + 0,0001$	0,993	6	2	86	92
<sup>153</sup> Eu	$y = 0,2225x + 0,0003$	0,991	$y = 0,2225x + 0,0003$	0,997	6	1	89	90
<sup>159</sup> Tb	$y = 0,1495x + 0,003$	1,000	$y = 0,1495x + 0,003$	0,999	2	1	93	96
<sup>160</sup> Gd	$y = 0,5277x + 0,0006$	0,999	$y = 0,5534x + 0,0352$	0,997	4	1	90	93
<sup>163</sup> Dy	$y = 0,1269x + 0,0037$	0,998	$y = 0,1367x + 0,0083$	0,998	5	1	90	93
<sup>165</sup> Ho	$y = 0,5245x + 0,0039$	1,000	$y = 0,5245x + 0,0039$	0,999	3	2	86	95
<sup>166</sup> Er	$y = 0,1846x - 0,0019$	0,998	$y = 0,1937x + 0,0069$	0,997	4	1	92	94
<sup>169</sup> Tm	$y = 0,57x + 0,0036$	0,999	$y = 0,5988x + 0,0106$	1,000	4	1	93	96
<sup>172</sup> Yb	$y = 0,131x + 0,0007$	1,000	$y = 0,131x + 0,0007$	0,998	5	2	98	99
<sup>175</sup> Lu	$y = 0,333x - 0,001$	1,000	$y = 0,3639x + 0,0175$	0,991	4	2	76	92
<sup>201</sup> Hg	$y = 0,0094x - 0,0025$	0,993	$y = 0,0091x - 0,0009$	0,991	4	2	<b>1907</b>	<b>2083</b>
<sup>206</sup> Pb	$y = 0,1242x - 0,005$	0,999	$y = 0,1223x - 0,0017$	0,999	16	7	113	<b>116</b>
<sup>238</sup> U	$y = 0,6203x + 0,001$	1,000	$y = 0,6203x + 0,001$	0,999	4	1	94	103

(Fonte: Autor)

Os resultados do teste de seletividade apontaram efeito de matriz para todos os analitos. Entretanto, avaliando os coeficientes de variação e recuperação obtidos, considerou-se adequado incluir a matriz rim suíno ao método com restrições para o mercúrio. O resultado para esse elemento foi na ordem de vinte vezes maior que as recuperações médias ideais precisam ser mais bem investigados, pois o teste for repetido e os resultados obtidos não se alteraram.

Tabela 24 - Parâmetros obtidos na avaliação da linearidade, seletividade e precisão e recuperação em musculatura de tilápia

(continua)

Analito	Linearidade e seletividade				Precisão		Recuperação	
	Matriz musculatura de tilápia	$r_w^2$	Matriz fígado bovino	$r_w^2$	%CV nível baixo	%CV nível médio	% nível baixo	% nível médio
<sup>27</sup> Al	$y = 0,0031x + 0,0031$	0,997	$y = 0,0031x + 0,0031$	0,993	13	5	102	91
<sup>51</sup> V	$y = 0,766x + 0,0187$	0,998	$y = 0,766x + 0,0187$	0,998	8	5	97	101
<sup>52</sup> Cr	$y = 0,9241x + 0,064$	0,997	$y = 0,9016x + 0,0301$	0,995	9	3	112	106
<sup>55</sup> Mn	$y = 0,1059x + 0,0321$	0,999	$y = 0,1073x + 0,0567$	0,997	3	3	95	97
<sup>56</sup> Fe	$y = 0,182x + 0,0364$	0,999	$y = 0,1684x - 0,0609$	0,977	5	4	<b>122</b>	106
<sup>59</sup> Co	$y = 0,3693x + 0,0142$	0,999	$y = 0,3475x + 0,0188$	0,987	5	2	98	105
<sup>60</sup> Ni	$y = 0,099x + 0,0031$	0,997	$y = 0,087x + 0,0044$	0,997	8	2	91	109

<sup>63</sup> Cu	$y = 0,2761x - 0,1677$	0,999	$y = 0,2761x - 0,1677$	0,974	2	2	108	<b>111</b>
<sup>66</sup> Zn	$y = 0,0111x + 0,0373$	0,939	$y = 0,0106x + 0,0157$	0,963	6	4	93	109
<sup>75</sup> As	$y = 0,0273x - 0,0063$	0,973	$y = 0,0288x - 0,001$	0,996	19	10	80	98
<sup>95</sup> Mo	$y = 0,0069x + 0,0005$	1,000	$y = 0,007x + 0,0005$	0,999	3	1	92	95
<sup>114</sup> Cd	$y = 0,1594x + 0,0021$	0,998	$y = 0,1594x + 0,0021$	0,992	3	1	115	109
<sup>121</sup> Sb	$y = 0,1854x + 0,0071$	0,998	$y = 0,1758x + 0,0074$	0,998	7	1	101	98
<sup>138</sup> Ba	$y = 0,3686x + 0,0243$	0,999	$y = 0,3686x + 0,0243$	0,999	5	3	113	100
<sup>139</sup> La	$y = 0,2884x + 0,0051$	1,000	$y = 0,321x + 0,0193$	0,997	4	2	54	79
<sup>140</sup> Ce	$y = 0,3468x + 0,0131$	0,999	$y = 0,3468x + 0,0131$	0,996	2	1	83	81
<sup>141</sup> Pr	$y = 0,3203x + 0,0067$	1,000	$y = 0,3203x + 0,0067$	0,990	3	2	86	82
<sup>146</sup> Nd	$y = 0,0634x + 0,0015$	0,999	$y = 0,0724x + 0,0037$	0,992	4	1	76	82
<sup>147</sup> Sm	$y = 0,0567x - 0,0006$	0,999	$y = 0,0567x - 0,0006$	0,993	3	3	83	82
<sup>153</sup> Eu	$y = 0,215x + 0,0047$	1,000	$y = 0,2362x + 0,0139$	0,997	6	1	88	85
<sup>159</sup> Tb	$y = 0,1459x + 0,0043$	1,000	$y = 0,1459x + 0,0043$	1,000	5	1	86	88
<sup>160</sup> Gd	$y = 0,5124x + 0,0094$	1,000	$y = 0,5534x + 0,0351$	0,997	5	2	80	87
<sup>163</sup> Dy	$y = 0,1231x + 0,004$	1,000	$y = 0,1367x + 0,0083$	0,998	5	3	80	86
<sup>165</sup> Ho	$y = 0,5037x + 0,0189$	0,999	$y = 0,5525x + 0,0181$	0,999	1	2	85	88
<sup>166</sup> Er	$y = 0,1767x + 0,0072$	1,000	$y = 0,1767x + 0,0072$	0,997	1	2	88	89
<sup>169</sup> Tm	$y = 0,5578x + 0,0154$	1,000	$y = 0,6013x + 0,0073$	1,000	2	1	88	89
<sup>172</sup> Yb	$y = 0,1275x + 0,0028$	0,998	$y = 0,1359x + 0,003$	0,998	4	2	94	91
<sup>175</sup> Lu	$y = 0,3189x + 0,0077$	1,000	$y = 0,3189x + 0,0077$	0,995	2	1	84	82
<sup>201</sup> Hg	$y = 0,0098x - 0,0021$	0,988	$y = 0,0098x - 0,0021$	0,991	8	4	<b>329</b>	<b>339</b>
<sup>206</sup> Pb	$y = 0,1246x + 0,0027$	0,998	$y = 0,1223x - 0,0017$	0,999	3	4	105	101
<sup>238</sup> U	$y = 0,6046x + 0,0129$	1,000	$y = 0,6046x + 0,0129$	0,999	2	1	92	96

(Fonte: Autor)

Os resultados do teste de seletividade apontaram efeito de matriz para todos os analitos. Entretanto, avaliando os coeficientes de variação e recuperação obtidos, considerou-se adequado incluir a matriz musculatura de peixe ao método com restrições para o mercúrio. Os resultados apresentaram recuperações na ordem de três vezes maiores que as recuperações médias ideais precisam ser mais bem investigados, pois o teste de recuperação foi repetido e os resultados obtidos não se alteraram.

Tabela 25 - Parâmetros obtidos na avaliação da linearidade, seletividade e precisão e recuperação em brânquia de tilápia

Analito	Linearidade e seletividade				Precisão		Recuperação	
	Matriz brânquia de tilápia	$r_w^2$	Matriz fígado bovino	$r_w^2$	%CV nível baixo	%CV nível médio	% nível baixo	% nível médio
<sup>27</sup> Al	$y = 0,007x + 0,029$	0,996	$y = 0,0085x + 0,0164$	0,975	14	5	102	89
<sup>51</sup> V	$y = 0,8239x + 0,0317$	0,998	$y = 0,7542x + 0,0586$	0,996	5	3	103	110
<sup>52</sup> Cr	$y = 1,0427x + 0,0408$	0,997	$y = 0,928x + 0,0913$	0,995	4	4	98	108
<sup>55</sup> Mn	$y = 0,1102x + 0,0271$	0,999	$y = 0,1049x + 0,0759$	0,998	2	2	103	101
<sup>56</sup> Fe	$y = 0,1551x - 0,031$	0,992	$y = 0,152x - 0,0869$	0,989	14	10	83	106
<sup>59</sup> Co	$y = 0,4979x - 0,0062$	0,999	$y = 0,4292x - 0,032$	0,987	2	1	97	111
<sup>60</sup> Ni	$y = 0,1294x + 0,0026$	0,998	$y = 0,1129x - 0,0048$	0,990	4	3	100	110
<sup>63</sup> Cu	$y = 0,2885x - 0,0923$	0,997	$y = 0,259x + 0,2797$	0,941	5	3	96	105
<sup>66</sup> Zn	$y = 0,0118x - 0,006$	0,998	$y = 0,0112x - 0,0289$	0,980	12	5	95	104
<sup>75</sup> As	$y = 0,0326x - 0,0009$	0,995	$y = 0,0329x - 0,0005$	0,995	17	3	99	98
<sup>95</sup> Mo	$y = 0,0069x - 0,0003$	1,000	$y = 0,007x - 7E-05$	0,999	1	2	104	98
<sup>114</sup> Cd	$y = 0,1725x + 0,0043$	0,999	$y = 0,1535x - 0,0048$	0,993	8	2	98	111
<sup>121</sup> Sb	$y = 0,182x + 0,0024$	0,998	$y = 0,172x + 0,0066$	0,997	7	3	105	107
<sup>138</sup> Ba	$y = 0,3763x - 0,0022$	0,998	$y = 0,3568x + 0,0155$	0,998	8	2	101	101
<sup>139</sup> La	$y = 0,3344x + 0,0066$	0,999	$y = 0,3993x + 0,0022$	0,989	2	1	94	86
<sup>140</sup> Ce	$y = 0,4x + 0,0052$	0,999	$y = 0,4699x - 0,0047$	0,997	2	1	99	86
<sup>141</sup> Pr	$y = 0,3508x + 0,003$	1,000	$y = 0,4175x + 0,0019$	0,997	3	2	94	84
<sup>146</sup> Nd	$y = 0,0713x + 0,0005$	0,999	$y = 0,0836x + 0,0006$	0,995	5	2	95	87
<sup>147</sup> Sm	$y = 0,0609x + 0,002$	0,998	$y = 0,0735x - 0,0005$	0,998	4	3	79	81
<sup>153</sup> Eu	$y = 0,2234x + 0,0069$	0,999	$y = 0,2645x + 0,0089$	0,997	4	2	92	85
<sup>159</sup> Tb	$y = 0,1594x + 0,0006$	0,999	$y = 0,1794x - 0,004$	0,998	2	1	97	86
<sup>160</sup> Gd	$y = 0,5535x + 0,0007$	0,999	$y = 0,6306x - 0,0022$	0,998	2	1	83	86
<sup>163</sup> Dy	$y = 0,1277x + 0,0074$	0,999	$y = 0,1543x - 0,0005$	0,996	1	1	96	90
<sup>165</sup> Ho	$y = 0,5261x + 0,0074$	0,999	$y = 0,5904x + 0,012$	0,998	3	1	95	95
<sup>166</sup> Er	$y = 0,1891x - 0,0008$	1,000	$y = 0,2135x - 0,0025$	0,996	2	2	97	91
<sup>169</sup> Tm	$y = 0,5652x + 0,0054$	0,999	$y = 0,6204x + 0,0073$	0,997	3	1	84	89
<sup>172</sup> Yb	$y = 0,1285x + 0,0025$	0,999	$y = 0,1431x + 0,0019$	0,997	2	1	93	91
<sup>175</sup> Lu	$y = 0,3141x + 0,0007$	1,000	$y = 0,3687x + 0,0164$	0,996	4	1	93	84
<sup>201</sup> Hg	$y = 0,016x + 0,0009$	0,937	$y = 0,0144x - 0,0035$	0,993	8	2	97	118
<sup>206</sup> Pb	$y = 0,1257x + 0,0047$	0,992	$y = 0,1251x + 0,0019$	0,998	3	3	110	102
<sup>238</sup> U	$y = 0,6327x - 0,0093$	0,999	$y = 0,6097x + 0,004$	0,999	1	2	106	102

(Fonte: Autor)

Os resultados do teste de seletividade apontaram efeito de matriz para todos os analitos. Entretanto, avaliando os coeficientes de variação e recuperação obtidos, considerou-se adequado incluir a matriz brânquia de peixe ao método.

## 6 CONCLUSÃO

Um método para determinação de 31 elementos, sendo eles metais, metalóides e terras raras, foi otimizado e validado para análise de amostras de fígado bovino.

O emprego do moedor Ultra Turrax® Tube Drive se mostrou eficiente como método alternativo de processamento de amostras de tecidos animais por ser mais rápido, mais barato e energeticamente eficiente que os métodos usualmente empregados. Ademais, conseguiu-se bons resultados com o uso de solução ácida diluída na digestão das matrizes estudadas.

Dessa forma, o método foi validado para a matriz proposta e realizados os procedimentos para expansão de escopo para rim bovino e suíno, fígado suíno de galinha e de peixe, sangue bovino e músculo e brânquias de peixe por meio da determinação via ICPMS-MS.

Sendo assim, conclui-se que a validação e expansão de escopo do método para determinação de metais e metalóides em amostras de tecidos animais atende os parâmetros determinados.

Futuramente espera-se fazer um estudo mais detalhado para investigação nos problemas encontrados nos resultados de mercúrio nas matrizes de músculo de peixe e rim suíno e zinco e alumínio em sangue bovino. Também se espera a realização de testes para diminuição do tempo de processamento da amostra no Ultra Turrax, além da utilização do método para análise de amostras reais.

## REFERÊNCIAS

- Adani, P., Sawale, A. A., & Nandhagopal, G. (2022). Bioaccumulation of heavy metals in the food components from water and sediments in the coastal waters of Kalpakkam, Southeast coast of India. *Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management*, 17. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2021.100627>
- Adetunji, V. O., Famakin, I. O., & Chen, J. (2014). Lead and cadmium levels in cattle muscle and edible tissues collected from a slaughter slab in Nigeria. *Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance*, 7(2), 79–83. <https://doi.org/10.1080/19393210.2013.848942>
- Agazzi, A., & Pirola, C. (2000). Fundamentals, methods and future trends of environmental microwave sample preparation. In *Microchemical Journal* (Vol. 67).
- Al-Hakkani, M. F. (2019). Guideline of inductively coupled plasma mass spectrometry “ICP–MS”: fundamentals, practices, determination of the limits, quality control, and method validation parameters. In *SN Applied Sciences* (Vol. 1, Issue 7). Springer Nature. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-0825-5>
- Amais, R. S., Virgilio, A., Schiavo, D., & Nóbrega, J. A. (2015). Tandem mass spectrometry (ICP-MS/MS) for overcoming molybdenum oxide interferences on Cd determination in milk. *Microchemical Journal*, 120, 64–68. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2015.01.008>
- Ammann, A. A. (2007). Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS): A versatile tool. In *Journal of Mass Spectrometry* (Vol. 42, Issue 4, pp. 419–427). <https://doi.org/10.1002/jms.1206>
- Aro, R., Carlsson, P., Vogelsang, C., Kärrman, A., & Yeung, L. W. (2021). Fluorine mass balance analysis of selected environmental samples from Norway. *Chemosphere*, 283. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131200>
- Balcaen, L., Bolea-Fernandez, E., Resano, M., & Vanhaecke, F. (2015). Inductively coupled plasma - Tandem mass spectrometry (ICP-MS/MS): A powerful and universal tool for the interference-free determination of (ultra)trace elements - A tutorial review. In *Analytica Chimica Acta* (Vol. 894, pp. 7–19). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.08.053>
- Barbosa, J. T. P., Santos, C. M. M., Peralva, V. N., Flores, E. M. M., Korn, M., Nóbrega, J. A., & Korn, M. G. A. (2015). Microwave-assisted diluted acid digestion for trace elements analysis of edible soybean products. *Food Chemistry*, 175, 212–217. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.092>
- Birungi, Z., Masola, B., Zaranyika, M. F., Naigaga, I., & Marshall, B. (2007). Active biomonitoring of trace heavy metals using fish (*Oreochromis niloticus*) as bioindicator

species. The case of Nakivubo wetland along Lake Victoria. *Physics and Chemistry of the Earth*, 32(15–18), 1350–1358. <https://doi.org/10.1016/j.pce.2007.07.034>

Bizzi, C. A., Pedrotti, M. F., Silva, J. S., Barin, J. S., Nóbrega, J. A., & Flores, E. M. M. (2017). Microwave-assisted digestion methods: Towards greener approaches for plasma-based analytical techniques. In *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* (Vol. 32, Issue 8, pp. 1448–1466). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c7ja00108h>

Bizzi, C. A., Flores, E. L. M., Nóbrega, J. A., Oliveira, J. S. S., Schmidt, L., & Mortari, S. R. (2014). Evaluation of a digestion procedure based on the use of diluted nitric acid solutions and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for the multielement determination of whole milk powder and bovine liver by ICP-based techniques. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 29(2), 332–338. <https://doi.org/10.1039/c3ja50330e>

Bizzi, C. A., Barin, J. S., Garcia, E. E., Nóbrega, J. A., Dressler, V. L., & Flores, E. M. M. (2011). Improvement of microwave-assisted digestion of milk powder with diluted nitric acid using oxygen as auxiliary reagent. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, 66(5), 394–398. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2011.04.013>

Bolte, K., Dziadosz, M., Kono, N., Vennemann, B., Klintschar, M., & Teske, J. (2021). Determination of drugs in exhumed liver and brain tissue after over 9 years of burial by liquid chromatography–tandem mass spectrometry—Part 2: Benzodiazepines, opioids, and further drugs. *Drug Testing and Analysis*, 13(7), 1318–1330. <https://doi.org/10.1002/dta.3029>

Bolte, K., Dziadosz, M., Kono, N., Vennemann, B., Klintschar, M., & Teske, J. (2021). Determination of drugs in exhumed liver and brain tissue after over 9 years of burial by liquid chromatography–tandem mass spectrometry—Part 1: Cardiovascular drugs. *Drug Testing and Analysis*, 13(3), 595–603. <https://doi.org/10.1002/dta.2940>

**BRASIL.** Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Manual de garantia da qualidade analítica. / Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: MAPA/ACS, 2011.

Bruce, P., Minkinen, P., & Riekkola, M.-L. (1998). Mikrochimica Acta Practical Method Validation: Validation Sufficient for an Analysis Method. In *Mikrochim. Acta* (Vol. 128).

Cai, Q., Long, M. L., Zhu, M., Zhou, Q. Z., Zhang, L., & Liu, J. (2009). Food chain transfer of cadmium and lead to cattle in a lead-zinc smelter in Guizhou, China. *Environmental Pollution*, 157(11), 3078–3082. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.05.048>

Carrilho, E. N. V. M., Gonzalez, M. H., Nogueira, A. R. A., Cruz, G. M., & Nóbrega, J. A. (2002). Microwave-assisted acid decomposition of animal- and plant-derived samples for element analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(15), 4164–4168. <https://doi.org/10.1021/jf011605x>

- Castro, J. T., Santos, E. C., Santos, W. P. C., Costa, L. M., Korn, M., Nóbrega, J. A., & Korn, M. G. A. (2009). A critical evaluation of digestion procedures for coffee samples using diluted nitric acid in closed vessels for inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Talanta*, *78*(4–5), 1378–1382. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.02.030>
- Chen, H. M., Zheng, C. R., Tu, C., & Shen, Z. G. (n.d.). (2000). *Chemical methods and phytoremediation of soil contaminated with heavy metals*. Chemosphere . 229–234
- Chevallier, E., Chekri, R., Zinck, J., Guérin, T., & Noël, L. (2015). Simultaneous determination of 31 elements in foodstuffs by ICP-MS after closed-vessel microwave digestion: Method validation based on the accuracy profile. *Journal of Food Composition and Analysis*, *41*, 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.12.024>
- Chua, E. M., Flint, N., Wilson, S. P., & Vink, S. (2018). Potential for biomonitoring metals and metalloids using fish condition and tissue analysis in an agricultural and coal mining region. *Chemosphere*, *202*, 598–608. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.080>
- D'Illio, S., Petrucci, F., D'Amato, M., di Gregorio, M., Senofonte, O., & Violante, N. (2008). Method validation for determination of cadmium and lead in offal by means of quadrupole inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(24), 11584–11588. <https://doi.org/10.1021/jf8028623>
- D'Illio, S., Petrucci, F., D'Amato, M., di Gregorio, M., Senofonte, O., & Violante, N. (2008). Method validation for determination of cadmium and lead in offal by means of quadrupole inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(24), 11584–11588. <https://doi.org/10.1021/jf8028623>
- Demirezen, D., & Uruç, K. (2006). Comparative study of trace elements in certain fish, meat and meat products. *Meat Science*, *74*(2), 255–260. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.03.012>
- Djedjibegovic, J., Larssen, T., Skrbo, A., Marjanović, A., & Sober, M. (2012). Contents of cadmium, copper, mercury and lead in fish from the Neretva river (Bosnia and Herzegovina) determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). *Food Chemistry*, *131*(2), 469–476. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.009>
- Dmowski, K. (n.d.). *Birds as bioindicators of heavy metal pollution: Review and examples concerning European species*. <https://www.researchgate.net/publication/279585006>
- Edwards, J. W., Edyvaneà, K. S., Boxall, V. A., Hamann, M., & Soole, K. L. (n.d.). *Metal Levels in Seston and Marine Fish Flesh Near Industrial and Metropolitan Centres in South Australia*. 2001.
- Ek, K. H., Morrison, G. M., Lindberg, P., & Rauch, S. (2004). Comparative tissue distribution of metals in birds in Sweden using ICP-MS and laser ablation ICP-MS.

*Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 47(2), 259–269.  
<https://doi.org/10.1007/s00244-004-3138-6>

Ek, K. H., Morrison, G. M., Lindberg, P., & Rauch, S. (2004). Comparative tissue distribution of metals in birds in Sweden using ICP-MS and laser ablation ICP-MS. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 47(2), 259–269.  
<https://doi.org/10.1007/s00244-004-3138-6>

EURACHEM. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. 2ed. 2014

Fallah, A. A., Saei-Dehkordi, S. S., Nematollahi, A., & Jafari, T. (2011). Comparative study of heavy metal and trace element accumulation in edible tissues of farmed and wild rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using ICPOES technique. *Microchemical Journal*, 98(2), 275–279. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2011.02.007>

García, M. H. D. M., Hernández Moreno, D., Soler Rodríguez, F., Beceiro, A. L., Álvarez, L. E. F., & López, M. P. (2011). Sex- and age-dependent accumulation of heavy metals (Cd, Pb and Zn) in liver, kidney and muscle of roe deer (*Capreolus capreolus*) from NW Spain. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 46(2), 109–116.  
<https://doi.org/10.1080/10934529.2011.532422>

Garitta, J. A., Fialho, L. L., de Oliveira, G. S., Maria, R. M., Pirola, C., Ferreira, A. G., & Nóbrega, J. A. (2021). Microwave-Assisted Acid Digestion: Evaluation of Reaction Vessel Design and Performance. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 32(4), 702–711. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20200222>

Gonzalez, M. H., Souza, G. B., Oliveira, R. v., Forato, L. A., Nóbrega, J. A., & Nogueira, A. R. A. (2009). Microwave-assisted digestion procedures for biological samples with diluted nitric acid: Identification of reaction products. *Talanta*, 79(2), 396–401. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.04.001>

Griboff, J., Wunderlin, D. A., & Monferran, M. v. (2017). Metals, As and Se determination by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) in edible fish collected from three eutrophic reservoirs. Their consumption represents a risk for human health? *Microchemical Journal*, 130, 236–244.  
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.09.013>

Györi, Z., Kovács, B., Daniels, P., Szabo, P., & Phillips, C. (2005). Cadmium and lead in Hungarian porcine products and tissues. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(6), 1049–1054. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2069>

Hashemi, M. (2018). Heavy metal concentrations in bovine tissues (muscle, liver and kidney) and their relationship with heavy metal contents in consumed feed. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 154, 263–267.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.02.058>

Horai, S., Watanabe, I., Takada, H., Iwamizu, Y., Hayashi, T., Tanabe, S., & Kuno, K. (2007). Trace element accumulations in 13 avian species collected from the Kanto area, Japan. *Science of the Total Environment*, 373(2–3), 512–525.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.10.010>

INMETRO DOQ-CGCRE - *Orientações para Adoção da NBR ISO/IEC 17025 Pelos Laboratórios e Credenciados e Postulantes ao Credenciamento*. Março, 2023.

Jarić, I., Višnjić-Jeftić, željka, Cvijanović, G., Gačić, Z., Jovanović, L., Skorić, S., & Lenhardt, M. (2011). Determination of differential heavy metal and trace element accumulation in liver, gills, intestine and muscle of sterlet (*Acipenser ruthenus*) from the Danube River in Serbia by ICP-OES. *Microchemical Journal*, 98(1), 77–81.

<https://doi.org/10.1016/j.microc.2010.11.008>

Jarić, I., Višnjić-Jeftić, željka, Cvijanović, G., Gačić, Z., Jovanović, L., Skorić, S., & Lenhardt, M. (2011). Determination of differential heavy metal and trace element accumulation in liver, gills, intestine and muscle of sterlet (*Acipenser ruthenus*) from the Danube River in Serbia by ICP-OES. *Microchemical Journal*, 98(1), 77–81.

<https://doi.org/10.1016/j.microc.2010.11.008>

Khalafalla, F. A., Ali, F. H., Schwagele, F., & Abd-El-Wahab, M. A. (2011). Heavy metal residues in beef carcasses in Beni-Suef abattoir, Egypt. In *Veterinaria Italiana* (Vol. 47, Issue 3). [www.izs.it/vet\\_italiana](http://www.izs.it/vet_italiana)

Kim, D. G., Kim, M. K., Shin, J. Y., & Son, S. W. (2016). Cadmium and lead in animal tissue (muscle, liver and kidney), cow milk and dairy products in Korea. *Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance*, 9(1), 33–37.

<https://doi.org/10.1080/19393210.2015.1114032>

Korn, M. das G. A., Morte, E. S. da B., dos Santos, D. C. M. B., Castro, J. T., Barbosa, J. T. P., Teixeira, A. P., Fernandes, A. P., Welz, B., dos Santos, W. P. C., dos Santos, E. B. G. N., & Korn, M. (2008). Sample preparation for the determination of metals in food samples using spectroanalytical methods - A review. In *Applied Spectroscopy Reviews* (Vol. 43, Issue 2, pp. 67–92).

<https://doi.org/10.1080/05704920701723980>

Kruger, P. C., Geraghty, C. M., & Parsons, P. J. (2010). Development of caprine liver quality control materials for trace element analysis of biological tissues. *Accreditation and Quality Assurance*, 15(8), 451–458. <https://doi.org/10.1007/s00769-010-0660-2>

Lehmann, S., Schulze, B., Thomas, A., Kamphausen, T., Thevis, M., Rothschild, M. A., & Mercer-Chalmers-Bender, K. (2018). Organ distribution of 4-MEC, MDPV, methoxetamine and  $\alpha$ -PVP: comparison of QuEChERS and SPE. *Forensic Toxicology*, 36(2), 320–333. <https://doi.org/10.1007/s11419-018-0408-y>

Lerch, O., & Sperling, S. (2010.). *Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) and GC/MS Determination of Polar and Non-polar Drugs and Pharmaceuticals in Post Mortem Brain Tissue*.

Luoma, S. N., & Rainbow, P. S. (2005). Why is metal bioaccumulation so variable? Biodynamics as a unifying concept. In *Environmental Science and Technology* (Vol. 39, Issue 7, pp. 1921–1931). <https://doi.org/10.1021/es048947e>

Maciel, J. v., Knorr, C. L., Flores, E. M. M., Müller, E. I., Mesko, M. F., Primel, E. G., & Duarte, F. A. (2014). Feasibility of microwave-induced combustion for trace element determination in *Engraulis anchoita* by ICP-MS. *Food Chemistry*, 145, 927–931. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.119>

Markowski, M., Kaliński, A., Skwarska, J., Wawrzyniak, J., Bańbura, M., Markowski, J., Zieliński, P., & Bańbura, J. (2013). Avian feathers as bioindicators of the exposure to heavy metal contamination of food. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 91(3), 302–305. <https://doi.org/10.1007/s00128-013-1065-9>

Massanyi, P., Stawarz, R., Halo, M., Formicki, G., Lukac, N., Cupka, P., Schwarcz, P., Kovacik, A., Tusimova, E., & Kovacik, J. (2014). Blood concentration of copper, cadmium, zinc and lead in horses and its relation to hematological and biochemical parameters. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 49(8), 973–979. <https://doi.org/10.1080/10934529.2014.894322>

Massanyi, P., Stawarz, R., Halo, M., Formicki, G., Lukac, N., Cupka, P., Schwarcz, P., Kovacik, A., Tusimova, E., & Kovacik, J. (2014). Blood concentration of copper, cadmium, zinc and lead in horses and its relation to hematological and biochemical parameters. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 49(8), 973–979. <https://doi.org/10.1080/10934529.2014.894322>

Meenu Gautam, Srishti Mishra, Madhoolika Agrawal, Chapter 11 - Bioindicators of soil contaminated with organic and inorganic pollutants, Editor(s): Supriya Tiwari, Shashi Agrawal, *New Paradigms in Environmental Biomonitoring Using Plants*, Elsevier, 2022, Pages 271-298, ISBN 9780128243510, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824351-0.00001-8>.

Millour, S., Noël, L., Kadar, A., Chekri, R., Vastel, C., & Guérin, T. (2011). Simultaneous analysis of 21 elements in foodstuffs by ICP-MS after closed-vessel microwave digestion: Method validation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(1), 111–120. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.04.002>

Miranda, M., López-Alonso, M., Castillo, C., Hernández, J., & Bedito, J. L. (2005). Effects of moderate pollution on toxic and trace metal levels in calves from a polluted area of northern Spain. *Environment International*, 31(4), 543–548. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2004.09.025>

Miranda, M., Bedito, J. L., Blanco-Penedo, I., López-Lamas, C., Merino, A., & López-Alonso, M. (2009). Metal accumulation in cattle raised in a serpentine-soil area: Relationship between metal concentrations in soil, forage and animal tissues.

*Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 23(3), 231–238.  
<https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2009.03.004>

Montaser, A., *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, Wiley. 1998.

Morshdy, A. E. M. A., el Bayomi, R. M., Abd El Galil, G. M., & Mahmoud, A. F. A. (2018). Heavy metal concentrations and their risk assessment in marketed slaughtered animals in Sharkia Governorate, Egypt. *Slovenian Veterinary Research*, 55, 103–112. <https://doi.org/10.26873/SVR-635-2018>

Mukherjee, I., Singh, U. K., Singh, R. P., Anshumali, Kumari, D., Jha, P. K., & Mehta, P. (2020). Characterization of heavy metal pollution in an anthropogenically and geologically influenced semi-arid region of east India and assessment of ecological and human health risks. *Science of the Total Environment*, 705. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135801>

Nageswara Rao, R., & Kumar Talluri, M. V. N. (2007). An overview of recent applications of inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) in determination of inorganic impurities in drugs and pharmaceuticals. In *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (Vol. 43, Issue 1, pp. 1–13). <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.07.004>

Nóbrega, J. A., Pirola, C., Fialho, L. L., Rota, G., de Campos Jordão, C. E. K. M. A., & Pollo, F. (2012). Microwave-assisted digestion of organic samples: How simple can it become? *Talanta*, 98, 272–276. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.06.079>

Nriagu, J., Boughanen, M., Linder, A., Howe, A., Grant, C., Rattray, R., Vutchkov, M., & Lalor, G. (2009). Levels of As, Cd, Pb, Cu, Se and Zn in bovine kidneys and livers in Jamaica. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(2), 564–571. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.05.001>

Nwude, D. O., Babayemi, J. O., & Abhulimen, I. O. (2011). Metal quantification in cattle: A case of cattle at slaughter at Ota Abattoir, Nigeria. *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences*, 3(9), 271–274. <http://www.academicjournals.org/JTEHS>

Packett, R., Dougall, C., Rohde, K., & Noble, R. (2009). Agricultural lands are hot-spots for annual runoff polluting the southern Great Barrier Reef lagoon. *Marine Pollution Bulletin*, 58(7), 976–986. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.02.017>

Panagos, P., van Liedekerke, M., Yigini, Y., & Montanarella, L. (2013). Contaminated sites in Europe: Review of the current situation based on data collected through a European network. In *Journal of Environmental and Public Health* (Vol. 2013). Hindawi Publishing Corporation. <https://doi.org/10.1155/2013/158764>

Parker, G. H., & Hamr, J. (2001). Metal levels in body tissues, forage and fecal pellets of elk (*Cervus elaphus*) living near the ore smelters at Sudbury, Ontario. *Environmental Pollution*. 113, 347–355. [www.elsevier.com/locate/envpol](http://www.elsevier.com/locate/envpol)

Paßlack, N., Mainzer, B., Lahrssen-Wiederholt, M., Schafft, H., Palavinskas, R., Breithaupt, A., Neumann, K., & Zentek, J. (2014). Concentrations of strontium, barium, cadmium, copper, zinc, manganese, chromium, antimony, selenium and lead in the equine liver and kidneys. *SpringerPlus*, 3(1), 1–10.  
<https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-343>

Pereira, V., Miranda, M., Sierra, J., Benedito, J. L., & López-Alonso, M. (2021). Toxic and essential trace element concentrations in different tissues of extensively reared sheep in northern Spain. *Journal of Food Composition and Analysis*, 96.  
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103709>

Peters, F. T., Drummer, O. H., & Musshoff, F. (2007). Validation of new methods. *Forensic Science International*, 165(2–3), 216–224.  
<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.05.021>

Rainbow, P. S. (1995). Biomonitoring of Heavy Metal Availability in the Marine Environment. In *Marine Pollution Bulletin* (Vol. 31).

Rocha, D. L., Batista, A. D., Rocha, F. R. P., Donati, G. L., & Nóbrega, J. A. (2013). Greening sample preparation in inorganic analysis. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* (Vol. 45, pp. 79–92). Elsevier B.V.  
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.12.015>

Said Muhammad, M. Tahir Shah, Sardar Khan, Health risk assessment of heavy metals and their source apportionment in drinking water of Kohistan region, northern Pakistan, *Microchemical Journal*, Volume 98, Issue 2, 2011, Pages 334-343, ISSN 0026-265X, <https://doi.org/10.1016/j.microc.2011.03.003>.

Sheikhzadeh, H., & Hamidian, A. H. (2021). Bioaccumulation of heavy metals in fish species of Iran: a review. In *Environmental Geochemistry and Health* (Vol. 43, Issue 10, pp. 3749–3869). Springer Science and Business Media B.V.  
<https://doi.org/10.1007/s10653-021-00883-5>

Sturm, J., Wienhold, P., Frenzel, T., & Speer, K. (2018). Ultra turrax® tube drive for the extraction of pesticides from egg and milk samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(22), 5431–5438. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1254-9>

Sturm, J., Wienhold, P., Frenzel, T., & Speer, K. (2018). Ultra turrax® tube drive for the extraction of pesticides from egg and milk samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(22), 5431–5438. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1254-9>

*ULTRA-TURRAX® Tube Drive System*. (n.d.). disponível em [www.ika.com/uttd\\_en](http://www.ika.com/uttd_en). Acesso: 22 mar. 2021.

Uren Webster, T. M., Bury, N., van Aerle, R., & Santos, E. M. (2013). Global transcriptome profiling reveals molecular mechanisms of metal tolerance in a

chronically exposed wild population of brown trout. *Environmental Science and Technology*, 47(15), 8869–8877. <https://doi.org/10.1021/es401380p>

Uren Webster, T. M., Bury, N., van Aerle, R., & Santos, E. M. (2013). Global transcriptome profiling reveals molecular mechanisms of metal tolerance in a chronically exposed wild population of brown trout. *Environmental Science and Technology*, 47(15), 8869–8877. <https://doi.org/10.1021/es401380p>

Vareda, J. P., Valente, A. J. M., & Durães, L. (2019). Assessment of heavy metal pollution from anthropogenic activities and remediation strategies: A review. In *Journal of Environmental Management* (Vol. 246, pp. 101–118). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.05.126>

Yin, L. L., Tian, Q., Shao, X. Z., Kong, X. Y., & Ji, Y. Q. (2015). Determination of Trace Elements in Edible Nuts in the Beijing Market by ICP-MS. In *Biomedical and Environmental Sciences* (Vol. 28, Issue 6, pp. 449–454). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.3967/bes2015.063>

Wayland, M., Judit, Ã., Smits, E. G., Grant Gilchrist, H., Marchant, T., & Keating, J. (2003). Biomarker Responses in Nesting, Common Eiders in the Canadian Arctic in Relation to Tissue Cadmium, Mercury and Selenium Concentrations. In *Ecotoxicology* (Vol. 12).

Weissmannová, H. D., & Pavlovský, J. (2017). Indices of soil contamination by heavy metals – methodology of calculation for pollution assessment (minireview). *Environmental Monitoring and Assessment*, 189(12). <https://doi.org/10.1007/s10661-017-6340-5>