

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

Liliani Pacheco Tavares Nazareth

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DE METAIS E  
METALÓIDES EM AMOSTRAS DE FÍGADO BOVINO *IN NATURA* POR  
ESPECTROMETRIA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X POR REFLEXÃO  
TOTAL**

**BELO HORIZONTE**

**2023**

UFMG/ICEX/DQ. 1.542

D. 837

Liliani Pacheco Tavares Nazareth

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DE METAIS E  
METALOIDES EM AMOSTRAS DE FÍGADO BOVINO *IN NATURA* POR  
ESPECTROMETRIA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X POR REFLEXÃO  
TOTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestra em Química.

Orientador: Prof. Guilherme Dias Rodrigues

Coorientadora: Prof. Clésia Cristina Nascentes

Belo Horizonte

2023

Ficha Catalográfica

N335d Nazareth, Liliani Pacheco Tavares.  
2023 Desenvolvimento de método para quantificação de metais e metalóides em amostras  
D de fígado bovino in natura por espectrometria de fluorescência de raios-x por reflexão  
total [manuscrito] / Liliani Pacheco Tavares Nazareth. 2023.  
100 f. : il., gráfs., tabs.

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

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais – Departamento de  
Química.

Bibliografia: f. 88-96.  
Anexos: f. 97-100.

1. Química analítica – Teses. 2. Química analítica quantitativa – Teses. 3. Alimentos – Análise – Teses. 4. Fluorescência de raio X – Teses. 5. Carne bovina – Teses. 6. Espectroscopia de fluorescência – Teses. 7. Preparação de amostra (Química) – Teses. 8. Metais – Teses. I. Rodrigues, Guilherme Dias, Orientador. II. Nascentes, Clésia Cristina, Coorientadora. III. Título.

CDU 043



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

UFMG

Programa de Pós-Graduação em Química  
Departamento de Química - ICEX

**"Desenvolvimento de Método para Quantificação de Metais e Metaloides em Amostras de Fígado Bovino *in natura* por Espectrometria de Fluorescência de Raios-x por Reflexão Total"**

**Liliani Pacheco Tavares Nazareth**

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Guilherme Dias Rodrigues - Orientador  
UFMG

Profa. Clésia Cristina Nascentes - Coorientadora  
UFMG

Dra. Helena Eugênia Leonhardt Palmieri  
CDTN

Profa. Leticia Malta Costa  
UFMG

Belo Horizonte, 26 de maio de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Guilherme Dias Rodrigues, Professor do Magistério Superior**, em 26/05/2023, às 11:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Clésia Cristina Nascentes, Professora do Magistério Superior**, em 26/05/2023, às 13:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Leticia Malta Costa, Professora do Magistério Superior**, em 26/05/2023, às 16:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Helena Eugênia Leonhardt Palmieri, Usuária Externa**, em 30/05/2023, às 14:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



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 **2330588** e o código CRC **4E216E3B**.

Aos meus amores: Nathália e Vinícius, dedico.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que está sempre presente em minha vida.

À Universidade Federal de Minas Gerais pela possibilidade de realização deste trabalho.

Ao professor Guilherme Dias Rodrigues pela orientação na realização deste trabalho.

À professora Clésia Cristina Nascentes pela co-orientação, por ser uma pessoa gentil, agradável, generosa, competente e responsável, qualidades que indicam a excelente profissional e ser humano que é. Agradeço pelos ensinamentos teóricos e experimentais, pela disponibilidade, compreensão, conselhos e apoio durante esta fase do mestrado.

Agradeço também às professoras Dra. Letícia Malta Costa e Dra. Elionai Cassiana de Lima Gomes, à pesquisadora Dra. Helena Palmieri que compuseram a banca e por aceitarem fazer parte da banca examinadora e pelas contribuições a este trabalho.

Aos amigos e companheiros CDTN pela amizade, apoio e compreensão.

Aos colegas do Centro de Referência Ambiental da UFMG, aos participantes do Projeto Brumadinho e ao laboratório 157 pelos momentos de aprendizado e descontração. Em especial à Guilhermina pela amizade.

Aos professores do Departamento de Química da UFMG que contribuíram para minha formação.

Ao ensino a distância (Universidade Aberta do Brasil) em especial aos professores: Amary Cesar Ferreira, Simone Tófani, Dayse Carvalho da Silva Martins e Nilma Soares da Silva e todos professores e tutores que participaram desse brilhante projeto que levou ensino público de qualidade aos variados pólos no interior de Minas Gerais.

Ao setor da pós-graduação pela cordialidade e presteza em todas as vezes que solicitei algo.

À minha família por todo amor, compreensão e apoio durante esta trajetória. Em especial ao Ely, Nathália, Vinícius e Felipe.

À minha querida mãe, D. Dircinéa, pelo exemplo e força. E também aos meus queridos irmãos e sobrinhos.

E a todos que de alguma forma contribuíram para esta conquista...

Muito obrigada!

“O alimento da esperança é a luta, ancorada no fazer, que possamos nos nutrir e alimentar os nossos sonhos. Ainda que doa, é tempo de primavera, ousemos plantar!” (Paulo Freire)

## RESUMO

Nesse trabalho foi desenvolvido um método para quantificação de metais e metaloides Al, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Rb, Sr, Nb, Cd, Ba, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Yb, Lu, Hg, Pb, Th e U em fígado bovino *in natura* por espectrometria de fluorescência de raios-X por reflexão total (TXRF). Análises multielementares permitem avaliar elementos essenciais, tóxicos e também possíveis traçadores químicos, que podem estabelecer uma relação de provável intoxicação com a origem dos contaminantes ambientais. O método consistiu na moagem do fígado bovino *in natura* com solução de HNO<sub>3</sub> em um triturador/moinho de bolas. A influência das variáveis concentração de HNO<sub>3</sub>, volume de ácido e tempo de moagem foram avaliadas por meio do planejamento fatorial fracionário 2<sup>3-1</sup>, sendo a melhor condição de otimização encontrada na concentração de HNO<sub>3</sub> 10 % v v<sup>-1</sup> e volume de 6 mL, em tempo de agitação de 12 minutos para posterior análise dos metais contidos na suspensão. A validação do método foi feita de acordo com os parâmetros recomendados pelo MAPA, incluindo limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), repetitividade, precisão intermediária, exatidão e robustez. Os materiais de referência certificados utilizados foram soluções padrão, além do MRC NIST 1577c Bovine Liver. A precisão do método foi avaliada por meio da matriz branca fortificada, sendo os coeficientes de variação obtidos nas etapas de repetitividade e precisão intermediária variaram de 2,22 a 18,7% e de 3,02 a 18,1%, respectivamente. A exatidão do método foi avaliada por meio dos resultados de porcentagem de recuperação obtidos nas etapas de repetitividade e de precisão intermediária, e pelo estudo da recuperação com o NIST 1577c, variando de 79 a 119%, para a maioria dos analitos investigados. Os limites de quantificação do método (LQM) obtidos estão adequados para a finalidade do método, sendo 0,11 mg kg<sup>-1</sup> para o As e 0,15 mg kg<sup>-1</sup> para o Pb. Em relação à robustez, o método mostrou-se robusto, pois os resultados das análises foram pouco afetados ao variar os fatores avaliados. Para aplicação do método, amostras de fígado bovino adquiridas na rede comercial, sendo quatro do interior de Minas Gerais e um da capital, foram analisadas e comparadas aos limites máximos permitidos pela Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), sendo os limites máximos tolerados (LMT) para o fígado bovino de 0,50 mg kg<sup>-1</sup> para o Pb e 1,0 mg kg<sup>-1</sup> para o As. Os resultados mostraram que as amostras de fígado bovino estudadas não apresentaram teores acima dos permitidos para esses metais e o método analítico desenvolvido apresentou simplicidade e bom desempenho, podendo ser empregado na análise de fígado bovino.

Palavras-chave: validação; metais; metaloides; fígado bovino; TXRF.

## ABSTRACT

In this work, a method was developed for the quantification of metals and metalloids Al, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Rb, Sr, Nb, Cd, Ba, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Yb, Lu, Hg, Pb, Th and U in in natura bovine liver by total reflection X-ray fluorescence spectrometry (TXRF). Multielement analyzes make it possible to evaluate essential and toxic elements, as well as possible chemical tracers, which can establish a relationship between probable intoxication and the origin of environmental contaminants. The method consisted of grinding the bovine liver in natura with an HNO<sub>3</sub> solution in a ball crusher/mill. The influence of the variables HNO<sub>3</sub> concentration, acid volume and milling time were evaluated using a 2<sup>3-1</sup> fractional factorial design, with the best optimization condition found in a HNO<sub>3</sub> concentration of 10% v v<sup>-1</sup> and a volume of 6 mL, with a stirring time of 12 minutes for further analysis of the metals contained in the suspension. Method validation was performed according to the parameters recommended by MAPA, including limits of detection (LD) and quantification (LQ), repeatability, intermediate precision, accuracy and robustness. The certified reference materials used were standard solutions in addition to MRC NIST 1577c Bovine Liver. The accuracy of the method was evaluated using the fortified white matrix, and the coefficients of variation obtained in the repeatability and intermediate precision steps ranged from 2.22 to 18.7% and from 3.02 to 18.1%, respectively. The accuracy of the method was evaluated using the recovery percentage results obtained in the repeatability and intermediate precision steps, and by studying the recovery with NIST 1577c, ranging from 79 to 119% for most of the investigated analytes. The limits of quantification of the method (LQM) obtained are adequate for the purpose of the method, being 0.11 mg kg<sup>-1</sup> for As and 0.15 mg kg<sup>-1</sup> for Pb. Regarding robustness, the method proved to be robust, as the results of the analyzes were little affected by varying the evaluated factors. For application of the method, samples of bovine liver acquired in the commercial network, four from the interior of Minas Gerais and one from the capital, were analyzed and compared to the maximum limits allowed by the Collegiate Board of the National Health Surveillance Agency (ANVISA), with the maximum tolerated limits (LMT) for bovine liver being 0.50 mg kg<sup>-1</sup> for Pb and 1.0 mg kg<sup>-1</sup> for As. The results showed that the bovine liver samples studied did not present levels above those allowed for these metals and the developed analytical method presented simplicity and good performance, being able to be used in the bovine liver analysis.

Keywords: validation; metals; metalloids; bovine liver; TXRF.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Rotas pelos quais as substâncias químicas podem interagir com o ambiente e atingir o homem. ....	23
Figura 2: Configurações dos espectrômetros de fluorescência de raios X por (A) dispersão de comprimento de onda, (B) dispersão de energia e (C) reflexão total. ....	35
Figura 3: Espectrômetro de fluorescência de raios de reflexão total, PICOFOX. ....	38
Figura 4: Configuração de uma fluorescência por reflexão total, com incidência, reflexão do raios-X sobre a amostra e posição do detector. ....	39
Figura 5: Etapas de preparo dos discos de quartzo para análises por TXRF. ....	42
Figura 6: Aplicação da amostra formando um filme fino de amostra sobre o disco. ....	43
Figura 7: Frequências de <i>Fourier</i> baixas e altas filtradas e as frequências de <i>Fourier</i> médias tomadas como o espectro corrigido de fundo. ....	44
Figura 8: Etapas preliminares do preparo da amostra a) fígado bovino <i>in natura</i> b) corte e quarteamento do fígado c) Fígado homogeneizado. ....	51
Figura 9: Descrição de procedimento para limpeza dos discos de quartzo. ....	52
Figura 10: Etapas iniciais do preparo da amostra: a) amostra picada com faca de cerâmica; b) pesagem da amostra; c) trituração da amostra em meio ácido no Ultraturrax. ....	55
Figura 11: Suspensão do fígado bovino após moagem em meio ácido. ....	55
Figura 12: Etapas finais do preparo da amostra, sendo: a) suspensão b) aplicação da gota c) gota aplicada no disco d) gota após secagem na estufa. ....	56
Figura 13: Sequência Analítica do método proposto. ....	57
Figura 14: Etapas da determinação do teor de cinzas do fígado bovino, sendo: ....	58
Figura 15: Gráfico referente a % de recuperação no planejamento fatorial fracionário $2^{3-1}$ com ponto central. ....	66
Figura 16: Parte do espectro da amostra de fígado bovino analisada no TXRF. ....	70
Figura 17: Espectro do MRC 1577c obtido no TXRF. ....	78
Figura 18: Espectro do fígado bovino da cidade de Belo Horizonte obtido no TXRF. ....	82

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação de desastres ambientais mundiais e nacionais .....	22
Tabela 2: Relação dos sintomas provocados pela contaminação de metais e metaloides.....	24
Tabela 3: Valores das concentrações de MRC NIST 1577a diante das duas técnicas analíticas. .....	45
Tabela 4: Condição de cada ensaio do planejamento fatorial fracionário $2^{3-1}$ para o procedimento de preparo de amostra.....	54
Tabela 5: Condições de preparo de amostra para o ensaio da exatidão utilizando o MRC-1577c. .....	61
Tabela 6: Condições para o preparo da suspensão para o ensaio da exatidão utilizando o MRC- 1577c. ....	61
Tabela 7: Condição do ensaio para o estudo da robustez.....	61
Tabela 8: Fatores para o estudo da robustez.....	62
Tabela 9: Condições experimentais para determinação de fígado bovino <i>in natura</i> .....	63
Tabela 10: Resultado do planejamento fatorial fracionário $2^{3-1}$ com ponto central para estudar o efeito da concentração e volume da solução extratora e tempo de Ultraturrax sobre a porcentagem de recuperação dos elementos certificados. ....	65
Tabela 11: % Erro relativo obtido para os experimentos do planejamento fatorial fracionário empregado para otimização do preparo das amostras. ....	66
Tabela 12: Dados normalizados do planejamento fatorial $2^{3-1}$ com ponto central para estudar o efeito da concentração e volume da solução ácida e tempo de moagem sobre a porcentagem de recuperação dos elementos certificados. ....	67
Tabela 13: Efeitos obtidos para as variáveis avaliadas no planejamento $2^{3-1}$ com ponto central, utilizado na otimização do procedimento de preparo da amostra de fígado bovino. ....	68
Tabela 14: Condição otimizada para o preparo da amostra de fígado bovino <i>in natura</i> .....	68
Tabela 15: Valores de estimativa de LD, LQ e recuperação para o padrão aquoso multielementar.....	70
Tabela 16: Estimativa para LD e LQ para o fígado bovino.....	73
Tabela 17: Teste de HORRAT para Repetitividade(Repe) e Precisão Intermediária (PI) .....	76
Tabela 18: Composição química (média $\pm$ incerteza de medição associada) do MRC15775c com sua taxa de recuperação. ....	77
Tabela 19: Resultados dos testes de robustez para o método de análise de fígado bovino por TXRF.....	79

Tabela 20: Composição de fígado bovino <i>in natura</i> dos minerais de acordo com a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO, em sua 4ª edição revisada e ampliada. ....	81
Tabela 21: Resultados dos teores dos metais e metaloides no fígado bovino <i>in natura</i> em Minas Gerais pela técnica TXRF. ....	81
Tabela 22: Valores referencias dos teores de Se, Cu, Zn em fígado bovino <i>in natura</i> em mg Kg <sup>-1</sup> .....	83
Tabela 23: Valores dos analitos em teores maiores utilizando as técnicas de TXRF e ICP-MS-MS. ....	84
Tabela 24: Valores dos analitos em teores menores utilizando as técnicas de TXRF e ICP-MS. ....	84

## LISTA DE ABREVIÇÃO

- AOAC – Association of Official Agricultural Chemists
- FAAS – Espectrometria de Absorção Atômica com Chama
- FAES – Espectrometria de Emissão Atômica com Chama
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ED-XRF – Espectrometria de Fluorescência de raios-X por Dispersão de Energia
- ETRs – Elementos Terras Raras
- EPI – Equipamento de Proteção Individual
- FRX – Fluorescência de raios-X
- GFAAS – Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite
- IARC – International Agency for Research on Cancer
- ICPOES – Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado
- ICP-MS – Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado
- ICP-MS/MS – Espectrometria de Massas Triplo Quadrupolo com Plasma Indutivamente Acoplado
- IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry
- INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
- ISO – International Organization for Standardization ([www.iso.ch](http://www.iso.ch))
- LD – Limite de Detecção
- LDI – Limite de Detecção Instrumental
- LDM – Limite de Detecção do Método
- LNM – Laboratórios Nacionais de Metrologia
- LMT – Limite Máximo Tolerado
- LQ – Limite de Quantificação
- LQI – Limite de Quantificação Instrumental
- LQM – Limite de Quantificação do Método
- MAPA – Manual de Garantia da Qualidade Analítica
- NIST – National Institute for Standards and Technology ([www.nist.gov](http://www.nist.gov))
- OIML – International Organization of Legal Metrology ([www.oiml.org](http://www.oiml.org))
- pH – Potencial Hidrogeniônico
- PNCRC – Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
- TACO – Tabela Brasileira de composição de alimentos

TMAH – Hidróxido de Tetrametilamônio

TXRF – Espectrometria de Fluorescência de Raios-X por Reflexão Total

VIRM – Virtual Institute for Reference Materials

WD-XRF – Espectrometria de Fluorescência de Raios-X por Dispersão de Comprimento de Onda

WHO – World Health Organization

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>21</b>
2.1 Metais tóxicos .....	21
2.2 Monitoramento de metais tóxicos em produtos de origem animal no Brasil e exterior .	25
2.3 Carnes para consumo .....	27
2.4 Métodos analíticos para detecção e quantificação de metais e metaloides.....	29
2.4.1 A importância do preparo da amostra.....	29
2.4.2 O planejamento fatorial no preparo da amostra.....	29
2.4.3 O preparo de amostras biológicas.....	30
2.4.4 Técnicas analíticas instrumentais .....	32
2.4.5 Espectrometria de fluorescência de raios-X por reflexão total.....	36
2.4.6 Exemplos de aplicações do TXRF.....	44
2.4.7 Validação de métodos.....	46
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>48</b>
3.1 Objetivo geral.....	48
3.2 Objetivos específicos .....	48
<b>4. METODOLOGIA .....</b>	<b>49</b>
4.1 Instrumentação e materiais.....	49
4.2 Especificações e condições instrumentais do espectrômetro de fluorescência de raios X por reflexão total-Picofox.....	50
4.3 Procedimentos experimentais.....	51
4.3.1 Coleta, etapas preliminares e acondicionamento das amostras .....	51
4.3.2 Limpeza e descontaminação do material.....	51
4.3.3 Preparo das soluções fortificadoras e padrão interno .....	53
4.3.4 Preparo das soluções ácidas.....	53
4.3.5 Higiene e segurança.....	53

4.3.6	Preparo das amostras empregando moagem ácida .....	54
4.3.7	Determinação do teor de umidade e cinzas ou resíduo mineral fixo .....	58
4.3.8	Controle de qualidade instrumental .....	58
4.3.9	Parâmetros de validação do método .....	59
4.3.9.1	Limite de detecção e limite de quantificação instrumental .....	59
4.3.9.2	Limite de detecção e limite de quantificação para o fígado bovino <i>in natura</i> 59	
4.3.9.3	Precisão por meio de matriz fortificada-Repetitividade e Precisão Intermediária.....	59
4.3.9.4	Exatidão por meio de Material de Referência Certificado .....	60
4.3.9.5	Robustez.....	61
4.3.10	Aplicabilidade do método.....	63
4.3.11	Comparação com outra técnica analítica .....	63
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>64</b>
5.1	Estudos preliminares .....	64
5.2	Desenvolvimento e Validação de Método Analítico .....	64
5.2.1	Otimização do método analítico .....	64
5.2.2	Determinação do teor de cinzas e umidade .....	69
5.2.3	Etapas da validação do método analítico.....	69
5.2.3.1	Limites de detecção e de quantificação.....	69
5.2.3.2	Limite de detecção e quantificação para o fígado bovino.....	72
5.2.3.3	Repetitividade, Precisão intermediária e exatidão .....	74
5.2.3.4	Exatidão por meio de material de referência certificado.....	76
5.2.3.5	Robustez.....	78
5.2.4	Quantificação das amostras comerciais .....	80
5.2.5	Comparação com outras técnicas analíticas .....	83
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>85</b>
<b>7.</b>	<b>TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>87</b>

<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>88</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>97</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A química analítica é a área da ciência responsável pelo desenvolvimento e aprimoramento de novas metodologias de análise, aplicáveis aos mais variados campos da pesquisa científica e em laboratórios de rotina exercendo um lugar notável nos grupos de pesquisa multidisciplinar, sendo imprescindível às determinações quantitativa e qualitativa de espécies químicas contidas em ampla variedade de amostras (NAGATA et al., 2001). É dividida em duas grandes partes: a analítica qualitativa, que aborda o reconhecimento dos constituintes presentes na amostra e a analítica quantitativa, que engloba os métodos e técnicas utilizados para determinar as quantidades relativas dos componentes presentes na amostra. As pesquisas científicas e os desenvolvimentos tecnológicos em muitas áreas das ciências, não seriam possíveis sem a participação da química analítica, com seus equipamentos e metodologias, produzidos pelos químicos analíticos (PASHKOVA et al., 2015).

O desenvolvimento de métodos analíticos para serem utilizadas em atendimento as normas da qualidade (ISO 17025) requer a um processo criterioso de validação. Ao validar um método analítico, por meio de um estudo experimental e documentado, evidencia-se que o procedimento analítico avaliado é adequado à finalidade proposta, de forma a colaborar com a confiabilidade dos resultados obtidos (MAPA, 2015).

Nesse estudo, o fígado de boi foi escolhido como matriz, por ser um produto alimentício nutritivo e rico em vitaminas, classificado como um dos “super-alimentos”, recomendado para ser incluído em nossa alimentação por nutricionistas e médicos fazendo parte de uma dieta saudável (CAMPOS, 2003). Entre as vitaminas e compostos benéficos presentes no fígado de boi constam as vitaminas A, B12, B3, B5, B6 e C, folato (ácido fólico), riboflavina, selênio, cobre, ferro e zinco. Entretanto este órgão é também considerado bioacumulador de metais (CAMPOS, 2003 e MARTIN, 2006), podendo apresentar elementos tóxicos. Por isto, as análises químicas de alimentos destinam-se a garantir que estes apresentem qualidade suficiente para serem consumidos.

A determinação dos teores de elementos tóxicos como o arsênio (As), cádmio (Cd), e chumbo (Pb) em carnes, faz parte do controle pelos órgãos fiscalizadores. A avaliação de outros elementos químicos é também importante para controle de nutrientes e elementos não essenciais

que possam ser utilizados como traçadores químicos, levando a uma associação de possível intoxicação com a origem dos contaminantes ambientais. Vale ressaltar, que o traçador químico pode ser considerado qualquer substância que pode ser usada para seguir o comportamento de um determinado sistema ou de um componente (MAGGIO et al., 1994). Exemplificando, pode-se citar o U e os elementos terras raras (ETRs) que podem ser encontrados em rejeitos de mineração de algumas matrizes e são menos associados a outras fontes de contaminação.

O desenvolvimento de modernas técnicas analíticas para a análise de alimentos, utilizando o mínimo de amostra de maneira eficaz, é necessário para gerar resultados confiáveis e que atendam as demandas do mercado (KRUG, 2016). Dentre as técnicas analíticas que podem ser utilizadas para a determinação de metais e metaloides, tem-se as técnicas consolidadas como as Espectrometrias de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS), a de Emissão óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES), a de Absorção Atômica com forno de grafite (GFAAS), Absorção Atômica em chama (FAAS) cada uma com suas particularidades, vantagens e desvantagens. Neste tipo de aplicação analítica, a espectrometria de fluorescência de raios-X, especificamente a fluorescência de raios-X por reflexão total (TXRF) vem se destacando por ser uma técnica analítica nuclear multielementar, não-destrutiva, com baixos limites de detecção e quantificação e com ótima frequência analítica. Os benefícios do TXRF são devido aos efeitos de matriz e ruído de fundo significativamente reduzidos. Uma diferencial do TXRF sobre as técnicas citadas anteriormente é a possibilidade de detectar halogênios (Cl, Br, I). Também a TXRF, possui amplo intervalo de medida ( $\mu\text{g kg}^{-1}$  a %) e nenhum consumo de gás ou água para resfriamento (BRUKER, 2012).

Na literatura, a técnica do TXRF vem sendo utilizada para a análise elementar de diversos tipos de matrizes, inclusive materiais biológicos (DE LA CALLE et al., 2013). Na Europa, o grupo ENFORCE TXRF desenvolve pesquisas utilizando a técnica do TXRF, como técnica analítica de referência para análise elementar de matrizes sólidas e líquidas, tendo como propósito a triagem rápida e determinação quantitativa, com objetivo final de elaborar um novo portfólio de tecnologia para aplicações TXRF que beneficiará a ciência, a economia e a sociedade.

Também, normas internacionais, como a “ISO/TS 18507:2015-Surface chemical analysis — Use of Total Reflection X-ray Fluorescence spectroscopy in biological and environmental analysis” e a “ISO/FDIS 20289:2017(E) INTERNATIONAL STANDARD I Surface Chemical analysis — Total reflection X-ray fluorescence analysis of water” comprovam a consolidação dessa técnica por meio de sua utilização nos laboratórios de pesquisa certificados.

Com base no exposto, essa dissertação buscou desenvolver um método analítico utilizando TXRF para identificar e quantificar metais e metaloides em fígado bovino *in natura*. A condição da amostra *in natura* e todo o desenvolvimento do método seguiu os princípios da Química Verde definidos por John Warner Paul Anastas em 1998, como prevenir a formação de resíduos tóxicos em análises químicas, reduzir o uso de solventes e o consumo de energia, e buscar por metodologias que sejam executadas à pressão e temperatura ambientes (eficiência de energia). Além disso, esse ramo da Química busca reduzir o consumo de matérias primas, como trabalhar com volumes menores de amostras e utilizar técnicas que independem do uso de gases (DIAS, 2022). Nesse contexto, o método proposto não utiliza a digestão assistida por radiação micro-ondas, nem a liofilização ou a utilização de outros métodos de preparo de amostras em que fosse necessário transformar a amostra em pó, reduzindo ainda mais o tempo de análise.

Após otimização e validação do método as amostras de fígado bovino da rede comercial de algumas regiões do estado de Minas Gerais foram analisadas quanto ao teor dos metais e metaloides. Nessa etapa, verificou-se a confiabilidade do método desenvolvido, comparando-se os resultados do TXRF com ICP-MS e as possíveis contaminações das amostras comerciais por metais tóxicos.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Metais tóxicos

Quando metais e metaloides presentes em alimentos estão acima dos limites máximos tolerados (LMT) estes podem ser perigosos para a saúde humana, pois podem danificar sistemas biológicos. Dentre os elementos da tabela periódica, alguns são considerados essenciais à vida, como é o caso do manganês, ferro, zinco e cobre. Outros, podem ser letais quando incorporados nos organismos em altas concentrações, tendo como exemplos clássicos o arsênio, cádmio, chumbo, mercúrio e urânio. Para MINDEL e MUNDIS (1996), os metais alumínio, arsênio, bário, berílio, cádmio, chumbo, mercúrio e níquel são considerados significativamente tóxicos para os seres vivos, pois podem alterar as estruturas celulares, as enzimas e substituir metais cofatores de atividades enzimáticas comprometendo sua função.

Atualmente, os estudos científicos mencionando os efeitos tóxicos dos metais nos organismos vivos são de grande interesse mundial, principalmente porque esses metais podem poluir os ecossistemas. Atividades antrópicas como produção industrial, mineração, uso de fertilizantes contaminados no solo, a queima de combustíveis fósseis, a queima de resíduos e produtos contendo metais tóxicos, bem como despejo de efluentes domésticos e industriais sem tratamento contribuem para o aumento da poluição do ecossistema (NRIAGU; PACYNA, 1988). Essas substâncias quando no solo podem ser lixiviadas pela água das chuvas atingindo os lençóis freáticos, contaminando-os e afetando assim a qualidade dessas águas, colocando em risco a vida dos animais vivos que delas dependem. Com certeza, se em níveis elevados, essas substâncias liberadas na água podem ser potencialmente prejudiciais para plantas e animais aquáticos. Além disso, esses elementos tóxicos podem afetar as águas não contaminadas contribuindo em grande escala para a escassez desse bem tão valioso para a vida terrestre (SEEBAUGH et al., 2005; SCHMITT-JANSEN et al., 2008).

A Tabela 01 apresenta alguns desastres vindos de indústrias e a relação de cada um deles com a substância tóxica envolvida. Eles causaram danos ambientais e a contaminação da população acarretando danos graves à saúde, levando em alguns casos, até mesmo à letalidade.

Tabela 1: Relação de desastres ambientais mundiais e nacionais

Ano	Desastre ambiental	Agente químico
1956	Desastre de Minamata no Japão. Estima-se que mais de 3.000 pessoas sofreram várias deformidades.	Derramamento de componentes com mercúrio durante décadas pela Corporação Chisso, uma empresa de fertilizantes.
1986	Acidente nuclear de Chernobyl (Pensilvânia): causou a morte de 56 pessoas, e estima-se que 4.000 outras pessoas venham a morrer de câncer relacionado à contaminação.	Várias substâncias radioativas contendo urânio, plutônio e céσιο.
1987	Acidente nuclear em Goiânia	Pastilha de sal de cloreto de céσιο (Cs-137) contida dentro de uma cápsula metálica cilíndrica de 3,6 cm de diâmetro por 3,0 cm de altura.
2007	Rompimento da barragem Bom Jardim em Mirai- Minas Gerais	Lama tóxica predominando alumínio.
2015	Rompimento da Barragem do Fundão, em Bento Rodrigues, Mariana, usada para guardar os rejeitos de minério de ferro, resultou na morte de 19 pessoas e na contaminação do rio, do solo, do mar e a destruição da flora.	Rejeito de mineração contendo metais tóxicos. (IBAMA, 2015) e MPF
Em 2019	Rompimento da Barragem Mina Córrego do Feijão em Brumadinho-Minas Gerais. Cerca de 14 milhões de toneladas de lama e rejeitos de minério de ferro percorreu 8 quilômetros em poucos dias, poluindo o rio Paraopeba, resultou na morte de 240 pessoas.	Lama e rejeitos de minério de ferro. (FELICIANO et al.; 2019)

Fonte: Adaptação feita do livro de Toxicologia, *Edilmere Sprada* - Instituto Federal do Paraná, 2013

As fontes de exposição a metais tóxicos em animais e humanos podem ser por vias oral, dérmica e pulmonar resultando em toxicidade crônica. Muitas patologias podem emergir quando certas substâncias tóxicas entram em nossa cadeia alimentar, podendo causar diversos

tipos de doenças no ser humano, como câncer, danos estomacais e pulmonares, além de alterações significantes nos sistemas imunológico e nervoso central. Dessa forma, é possível entender os efeitos nocivos que elementos tóxicos podem causar nos humanos (MANZINI et al., 2010).

Os metais tóxicos presentes na água, solo e ar, de origem natural ou antrópica, podem bioacumular e causar intoxicações graves ao longo da cadeia alimentar. A concentração desses elementos deve ser estudada, pois após seu acúmulo, podem chegar aos consumidores finais através dos alimentos e se tornar um problema de saúde pública (PEREIRA E EBECKEN, 2009). A Figura 1 ilustra algumas rotas pelos quais as substâncias químicas podem interagir com o ambiente e atingir o homem.

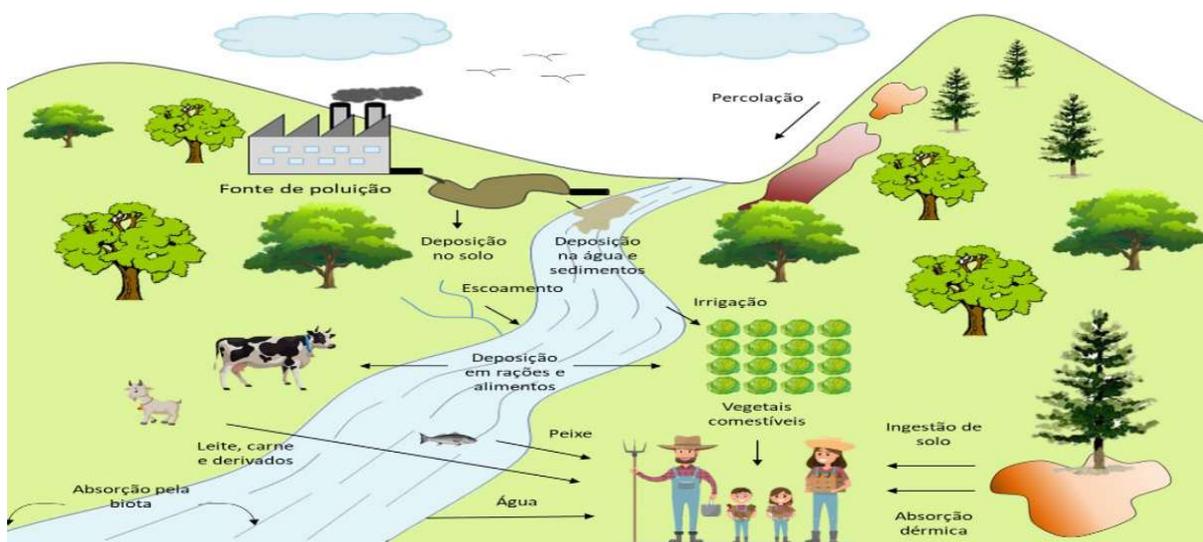


Figura 1: Rotas pelos quais as substâncias químicas podem interagir com o ambiente e atingir o homem.

Fonte: Adaptado de Paustenbach, 2001.

Na Tabela 02 são apresentadas informações a respeito da toxicidade de alguns metais e metaloides para animais.

Tabela 2: Relação dos sintomas provocados pela contaminação de metais e metaloides.

<b>Elemento</b>	<b>Sintomas</b>	<b>Referência</b>
Alumínio	Exposições crônicas podem ter efeito de toxicidade para os animais, podendo apresentar neurotoxicidades e alterações no desenvolvimento embrionário. Além disso, pode causar deposição ou substituir elementos com função fisiológica.	Yokel, 1997
Arsênio	As espécies inorgânicas e orgânicas de arsênio trivalente causam problemas gastrointestinais, enquanto as orgânicas de arsênio causam uma síndrome neurológica. Além disso, além de se acumular em grandes quantidades nos órgãos e atravessar a barreira placentária, o arsênio pode causar anemia, infarto de miocárdio e efeitos neurotóxicos.	Garland, 2007 Yokel, 1997
Chumbo	Sua toxicidade se relaciona com inibições e alterações no metabolismo do cálcio e da vitamina D. Além de interagir com diversas proteínas e se acumular nos ossos, o chumbo pode causar danos no sistema neurológico e hematológico.	Thompson, 2007 Francisco et al., 2003
Cobre	Intoxicações por cobre se relacionam com irritação gastrointestinal, podendo causar erosão da mucosa. Pode se acumular no fígado de forma assintomática ou de forma sintomática, resultado da necrose hepática. Além disso, o cobre pode se acumular nos rins, comprometendo-os.	Bremner, 1998 Du et al., 1996
Cromo	Exposições crônicas ao cromo podem causar gastroenterite e dermatite. Além disso, é possível que se acumulem nos testículos, de forma tóxica para os mamíferos, comprometendo a mobilidade espermática, o que resulta na disfunção reprodutiva.	Marouani et al. 2012 Wise et al., 2015 Li et al., 2001
Ferro	O excesso de ferro pode causar danos aos órgãos, gerando incapacidade de transporte de oxigênio pelos glóbulos vermelhos. Além disso, podem causar doenças neurodegenerativas, acúmulo não patológico e acúmulo nos tecidos. Em aves, pode causar dispneia, insuficiência hepática e até mesmo a morte.	Hooser, 2007 Connor et al., 1995; Lan e Jiang, 1997; Fredriksson et al., 1999; Dal-

		Pizzol et al., 2001
Manganês	Em excesso, pode causar envenenamento. Se absorvido pelos pulmões, pode levar à inflamação e facilitar a infecção destes em animais, além de alterar as funções cardíacas, inibindo a contração do miocárdio, dilatando os vasos sanguíneos e reduzindo a pressão arterial. A absorção oral pode afetar a reprodução e ter efeitos neurocomportamentais. Sua toxicidade também reduz o crescimento e ganho de peso, anemia, lesões gastrointestinais e aumento de ésteres e triglicerídeos no sangue de animais.	O'Neal &Zheng, 2015  Reis et al., 2010
Mercúrio	É um elemento altamente tóxico, sendo os organomercuriais mais tóxicos que as espécies inorgânicas. Pode se acumular nos rins e, com menor proporção, no fígado, além de se bioacumular, o que causa uma biomagnificação por meio da cadeia alimentar. Para todas as espécies, o mercúrio pode causar sérios danos ao cérebro e embriões. Em gatos, observa-se salivacão excessiva, marcha descontrolada, convulsões e alteração de comportamento. Pode causar a falência dos rins e se acumular no fígado, pelos e sangue de mamíferos.	Bampidis et al., 2013  Basri et al., 2017 Evers, 2018
Zinco	De acordo com o tempo de exposição, a toxicidade do zinco se relaciona com desidratação, desequilíbrio eletrolítico, náuseas, letargia, descoordenação motora, artrite, claudicação, anemia, anorexia e perda de peso.	Hill & Shannon, 2019  Reis et al., 2010

## 2.2 Monitoramento de metais tóxicos em produtos de origem animal no Brasil e exterior

A Comissão do *Codex Alimentarius* é uma iniciativa conjunta da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e da Organização Mundial da Saúde (OMS), encarregada de proteger a saúde do consumidor. A coordenação do *Codex Alimentarius* é exercida desde 1980 no Brasil pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO, 2016), quando foi criado o Comitê do *Codex Alimentarius* do Brasil (CCAB), instituído pela Resolução CONMETRO - Conselho Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial nº 01, de 17 de março de 1980 e reestruturado através das Resoluções

CONMETRO nº 07, de 26 de julho de 1988, nº 01 de 16 de junho de 1989, nº 12 de 24 de agosto de 1992 e nº 05 de 26 de maio de 1993.

O *Codex Alimentarius* é a legislação internacional mais utilizada para o controle de contaminantes em alimentos, assim orienta o desenvolvimento de definições e exigências para os alimentos. Seu escopo inclui parâmetros para os principais tipos de alimentos, como os processados, os semi-processados e os crus, além de todo o tipo de material envolvido durante o processo. Os controles oficiais quanto à fiscalização ficam sob a responsabilidade do MAPA e da ANVISA para os metais tóxicos em produtos de origem animal.

O Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento realiza no Brasil o monitoramento anual em produtos de origem animal como carnes, mel, ovos, etc. RDC N<sup>o</sup> 42 de 29 de agosto de 2013 – Regulamento Técnico Mercosul sobre limites Máximos de Contaminantes Inorgânicos em Alimentos. Também nesse contexto, a Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), no uso das atribuições que lhe confere o art. 15, III e IV, aliado ao art. 7<sup>o</sup>, III e IV da Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999, e ao art. 53, VII, §§ 1<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup>, do Regimento Interno aprovado pela Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 255, de 10 de dezembro de 2018, adota a Instrução Normativa, conforme deliberado em reunião realizada em 25 de março de 2021, determinando os limites máximos tolerados (LMT) de contaminantes em alimentos. Para o fígado bovino, somente os elementos cádmio (Cd), chumbo (Pb) e arsênio (As) estão especificados nesta normativa e com valores de até 0,5 mg kg<sup>-1</sup> para Cd e Pb e 1,0 mg kg<sup>-1</sup> para o As. Esses metais tóxicos despertam grande preocupação, tanto por uma questão econômica, na medida que a presença desses contaminantes em carnes constitui uma barreira para a exportação do produto, quanto pela toxicidade desses resíduos a saúde do consumidor, classificados como carcinogênicos humano pela Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer – IARC. (IARC, 2020; Brasil, 1999).

A Agência Internacional para a Investigação do Câncer (*International Agency for Research on Cancer, IARC*), classifica os metais As, Cd, Pb, Cr (VI), Be, Ni, U e Th como pertencentes ao grupo dos agentes comprovadamente carcinogênicos para humanos (IARC, 2020). As matrizes ambientais também são reguladas nos *EUA* pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (*United States Environmental Protection Agency, EPA*), onde limites máximos

são estabelecidos para água, solos, sedimentos etc. (EPA, 2010; ASTDR, 1992). É a partir da contaminação do meio ambiente, que esses metais são introduzidos na cadeia alimentar, sendo fundamental o controle de contaminantes inorgânicos nestas matrizes.

O Brasil passou a ser a 2<sup>a</sup> maior reserva mundial de Terras Raras com a incorporação de expressivas reservas em Minas Gerais (MG) e Goiás (GO) detendo, ao final de 2012, cerca de 16% do total mundial. Assim, outros elementos químicos estratégicos como os ETRs, devido aos inúmeros avanços tecnológicos no mercado global são de grande importância a monitoração nos alimentos, visto que esses ETRs podem ser tóxicos e levar a contaminação ambiental. (HEIDER, 2008)

O investimento em políticas públicas voltadas para esse tema deve ser feito de maneira contínua, colocando centros de pesquisas, universidades e empresas em um mesmo diálogo para alcançar protagonismo científico e dependência econômica frente a países que hoje controlam esse setor.

Estudos são necessários para fornecer informações essenciais e quantitativas dos contaminantes inorgânicos em carnes para uma melhor compreensão da realidade e, assim, auxiliar os órgãos de saúde pública e ambientais em suas ações de controle.

### **2.3 Carnes para consumo**

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, a pecuária é uma das principais atividades do agronegócio brasileiro, sendo o Brasil detentor do segundo maior rebanho do mundo, sendo que esse consumo também pode ser influenciado com base em fatores econômicos e comerciais, como preço e qualidade (BRASIL, 2020).

As carnes caracterizam-se pela natureza das proteínas que a compõem, com a sua riqueza em aminoácidos essenciais, além de conter umidade, ácidos graxos essenciais, vitaminas, glicídios e sais minerais como elementos nutritivos complementares para o ser humano. É um alimento nobre devido à função plástica na formação de novos tecidos orgânicos, na produção de energia e na regulação dos processos fisiológicos, apresentando a biodisponibilidade de seus nutrientes. O conhecimento da composição dos alimentos consumidos no Brasil é imprescindível para garantir a segurança alimentar do país. Uma vez que, fornece elementos

básicos para ações de orientação nutricional baseados em princípios de desenvolvimento local, diversificação da alimentação e desenvolvimento de novos produtos (TACO, 2011).

As vísceras são os órgãos internos dos animais (como boi, frango e porco, por exemplo), especificamente, os órgãos encontrados no crânio, no abdômen e no tórax e são consideradas fonte de alimentos para consumo. O fígado bovino merece maior destaque, pois é rico principalmente em ferro, cobre, selênio e zinco. Além desses elementos, também é fonte importante de vitamina A, na forma de retinol (essencial para pele, visão), vitaminas do complexo B, principalmente B12 e B2 e B3 e proteínas de alto valor biológico. O consumo de vísceras, tem trazido apreensão para o meio científico. Isso, devido à importância do fígado e dos rins no metabolismo de metais traços e a vulnerabilidade desses órgãos para acumulação e toxicidade. Segundo *Harlia* e colaboradores, em sua publicação no ano de 2015, a carne bovina é passível de contaminação química por metais tóxicos desde o nascimento do animal. Isto, devido evidentemente a contribuição de fatores ambientais.

O fígado bovino é um órgão sólido altamente vascularizado, onde a maioria das substâncias são metabolizadas, assim é provável que ocorra a retenção de muitos metais e metaloides. Desta forma, é importante controlar as concentrações de metais e metaloides em fígado, para minimizar possíveis impactos à saúde dos consumidores.

A Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2011), elaborada pelo Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação – (NEPA), da Universidade de Campinas, tem como objetivo gerar dados sobre a composição dos principais alimentos consumidos no Brasil, baseado em um plano de amostragem que garanta valores representativos, por meio de análises realizadas por laboratórios com capacidade analítica comprovada através de estudos interlaboratoriais, a fim de assegurar a confiabilidade dos resultados. Esta tabela, nos anexos, contém informações sobre a constituição do fígado bovino sendo uma referência para as amostras frescas.

## **2.4 Métodos analíticos para detecção e quantificação de metais e metaloides**

### **2.4.1 A importância do preparo da amostra**

A análise direta de sólidos usando técnica instrumental é, em princípio, o procedimento ideal para os analistas, pois a determinação do elemento de interesse pode ser feita diretamente da amostra, e a sequência analítica ficará restrita a poucas etapas, tornando-se mais simples. Entretanto, ainda são poucos os equipamentos com desempenho apropriado para determinação direta. Assim, é necessário um procedimento adequado para tratamento da amostra visando a sua preparação para a determinação dos analitos. O preparo da amostra pode ser desde um simples polimento da superfície da amostra até a completa transformação da amostra sólida em uma solução compatível com a técnica de determinação. A maneira de se decompor a amostra irá depender da sua natureza, do elemento a ser determinado e sua concentração, do método de determinação, e da precisão e exatidão desejadas (SKOOG, 2006).

Uma adequada técnica de decomposição de uma amostra deverá, de uma maneira geral, ser eficiente, evitando erros sistemáticos provenientes de contaminação, sendo importante o uso de reagentes de alta pureza (incluindo a água utilizada nas diluições), perdas por volatilização ou digestão incompleta; ser reproduzível, apresentar baixos limites de detecção (baixos valores do branco), ser seguro (quanto aos reagentes usados, manuseio, equipamento) e, sempre que possível, ser simples e rápido, com mínima manipulação (SKOOG, 2006).

O desenvolvimento de um procedimento de preparo de amostras que resulte em uma completa solubilização, na retenção de elementos voláteis, redução das contaminações do frasco e da atmosfera, baixos valores de branco dos reagentes e rapidez é um dos pontos mais desafiadores de uma análise química. Atualmente, uma técnica de preparo de amostra que seja única para todos os métodos não existe, devem ser observados, prioritariamente, a matriz da amostra e os elementos a serem determinados (HOENIG, 2001).

### **2.4.2 O planejamento fatorial no preparo da amostra**

O preparo da amostra é uma etapa que normalmente requer a avaliação de muitas variáveis como tipo e concentração dos reagentes, tempo e temperatura de digestão/extração, etc. Neste contexto, a metodologia de planejamento fatorial, uma ferramenta fundamentada na teoria estatística que fornece informações seguras sobre o processo e minimiza o empirismo

que envolve técnicas de tentativa e erro, é uma estratégia interessante. Os planejamentos fatoriais avaliam a influência das variáveis sobre as respostas desejadas, permitindo a otimização de processos e metodologias analíticas, que, através de uma condição otimizada, reduz custos e tempo, possibilita menor uso de reagentes e amostra, melhorando a eficiência dos processos. Assim diferentes metodologias de planejamentos fatoriais podem ser utilizadas (BUTTON, 2016).

O uso do planejamento de experimentos apresenta uma gama de vantagens, como, por exemplo, a redução do número de experimentos ou repetições necessárias e o melhoramento da qualidade da informação que se obtém no final. Isso causa uma diminuição de trabalho e conseqüentemente do tempo e dos recursos. Por meio dessa análise, pode-se verificar e quantificar efeitos que sejam divergentes. Essa característica permite que mais de uma resposta seja otimizada ao mesmo tempo. Além disso, é possível calcular e avaliar o erro experimental (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

Para utilizar o planejamento experimental, é necessário uma série de cálculos, sendo assim, é essencial o uso de softwares com funções estatísticas, como o Software Statistica e Design Expert (TAHARA, 2008).

Após a definição dos fatores significativos, deve-se utilizar o método de superfície de resposta para otimizar o procedimento, ou seja, encontrar a região (condições experimentais) onde há os maiores valores da resposta de interesse. Para tal, os planejamentos mais utilizados são Composto Central (CCD) e Doehlert (DOEHLERT, 1970)

### **2.4.3 O preparo de amostras biológicas**

O armazenamento da amostra biológica é de grande importância, sendo que na maioria dos casos devem ser resfriadas a temperatura baixas para reduzir a atividade microbológica e garantir a estabilidade da amostra. Para períodos curtos, podem ser resfriadas em refrigerador e para períodos maiores devem ser congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A vantagem adicional da refrigeração como método de preservação é que ela não afeta a composição da amostra nem interfere em nenhum método analítico (KRUG, 2016).

O ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) é o agente oxidante mais utilizado na digestão de amostras orgânicas, pois libera os elementos na forma de nitratos solúveis e é normalmente

comercializado em forma bastante pura, a 65 – 69% (> 69 %, HNO<sub>3</sub> “fumegante”), com ponto de ebulição de 122 °C. A maioria das amostras orgânicas é oxidada quase completamente, deixando os elementos a serem determinados na solução ácida em formas inorgânicas simples e apropriadas para análise (KINGSTON *et al.*, 1988, KRUG *et al.*, 2000).

Em se tratando de amostras biológicas, o preparo é comumente realizado e bem consolidado, por meio de decomposições assistidas por radiação micro-ondas. Este tipo de digestão possui a limitação de uso de massas de amostras relativamente pequenas, devido à possibilidade de aumento da pressão interna gerada pelos produtos gasosos nas reações de decomposição. Além disso, atenção deve ser dada quanto à homogeneidade das amostras, para evitar diferenças entre os frascos durante a decomposição. Uma desvantagem da digestão por micro-ondas é a necessidade de resfriamento e despressurização dos frascos para adição de reagentes durante o ciclo de aquecimento (SKOOG, 2006).

Na literatura várias estratégias utilizando outros preparos tem se mostrado muito eficientes, como as desenvolvidas e consolidadas técnicas tradicionais de extração líquido-líquido (liquid-liquid extraction - LLE) e a extração em fase sólida (solid phase extraction - SPE). Também o emprego da energia proveniente de aquecimento e ultrassom para aumentar a eficiência e reduzir o tempo de preparo de amostras vem sendo bastante explorado nas últimas décadas (CAMPOS *et al.*, 2015).

Os métodos de extração de espécies de amostras sólidas baseados na dessorção, solvatação e difusão do analito da matriz, permitindo a transferência para a fase líquida é uma alternativa para determinação de metais, em que o solvente extrator é selecionado em função das características da matriz e das espécies a serem extraídas. A extração sólido-líquido pode ser mais eficiente pela ação externa por exemplo, agitação mecânica ou magnética, temperatura ou pressão (BARBOSA *et al.*, 2014).

O preparo da amostra na forma de suspensão, em que a amostra sólida deve estar distribuída homogeneamente no volume do líquido, é uma opção que se adequa de forma alternativa para análises em técnicas de espectrometria de fluorescência de raios-X. O termo suspensão é usado para descrever um fluido heterogêneo contendo partículas dispersas com diâmetro maior que 1 µm (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Entre as vantagens relacionadas ao uso da suspensão na determinação da composição elementar de uma matriz se destacam a versatilidade, simplicidade operacional e rapidez no preparo das amostras (SILVA *et al.*, 2009). O preparo da amostra em forma de suspensão é muito utilizado nos desenvolvimentos do TXRF, sendo a suspensão o segundo tipo de preparo mais utilizado pela técnica (DE LA CALLE *et al.*, 2013). Para materiais biológicos e alimentos, o preparo da amostra em forma de suspensão para o TXRF foram utilizados nos estudos de muitos autores (DE LA CALLE *et al.*, 2012), alimentos (STOSNACH, 2010 e MARGUI *et al.*, 2014).

A indústria de instrumentação para o preparo de amostras biológicas tem desenvolvido diversos equipamentos com menores custos e consumo de energia auxiliando num eficiente preparo de amostras, além dos atualmente consolidados, como exemplos tem-se tecnologias avançadas em ondas ultrassônicas, infravermelho e radiação ultravioleta (KRUG, 2019).

#### **2.4.4 Técnicas analíticas instrumentais**

As técnicas instrumentais de análise química são separadas em três grandes áreas principais: a Cromatografia, técnicas de separação e identificação de componentes de uma mistura; a Eletroquímica, responsável pelo estudo das reações que abrangem a transferência de elétrons e a transformação de energia química em energia elétrica; e a Espectroscopia, que tem como princípio a interação da radiação eletromagnética com a matéria. Cada uma dessas áreas caracteriza-se por suas peculiaridades e pelos componentes químicos de interesse viáveis de identificação e/ou quantificação (SKOOG, 2006).

As técnicas de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICPOES) e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) possibilitam uma ampla faixa de detecção e quantificação de diferentes elementos. Estas técnicas têm em comum a utilização de uma fonte de plasma indutivo no equipamento com a função de atomizar e ionizar os elementos de uma amostra em estudo. O plasma utilizado é formado pela ionização de um gás inerte, como o argônio, que flui por uma tocha envolta por uma bobina de cobre conectado a um gerador de radiofrequência. Quando o gás está fluindo, é criada uma faísca (semente de elétrons) que gera o início da ionização do argônio. A transferência de energia para os elétrons através da bobina é chamada acoplamento indutivo. Esses elétrons altamente energizados induzem a ionização adicional do gás resultando em um

plasma com temperaturas variando entre 7000-10000 K, que são suficientes para promover a atomização e ionização da maioria dos elementos químicos. (KRUG, 2016).

A técnica ICP OES baseia-se na medição da radiação eletromagnética emitida por átomos ou íons excitados pelo plasma nas regiões do espectro visível e ultravioleta (160–800 nm). A amostra a ser analisada é utilizada na forma de solução e passa por um processo de nebulização para ser enviada para vaporização, atomização, ionização e excitação (transição de um estado de menor energia para um de maior energia) na fonte de plasma e assim fornecer os espectros de emissão. Cada elemento emite radiação em comprimentos de onda específicos, devido as transições eletrônicas entre níveis de energia diferenciados para cada espécie química quando absorvem energia oriunda da tocha de plasma. Isto permite determinar as identidades dos elementos presentes na amostra e a intensidade da radiação emitida é utilizada para sua quantificação, tornando, assim, o ICP OES uma técnica muito seletiva e ampla de análise. Porém, há limitações para a determinação dos átomos C, H, O e N devido ao uso de solventes que os contenham na estrutura e por estarem presentes normalmente no ar, o que causa interferências grandes. (KRUG, 2016)

O ICP-MS baseia-se na medição do número de íons gerados quando a amostra, que passa por nebulização prévia, é aquecida pelo plasma e estes são separados de acordo com suas razões massa/carga. A técnica possibilita a análise com baixo limite de detecção, normalmente, na ordem de  $\text{pg mL}^{-1}$  de analito na amostra. Algumas interferências relativas à matriz da amostra podem surgir como a presença de íons poliatômicos com mesma massa que o analito, sobreposição de sinais e bloqueio do nebulizador. (KRUG, 2016)

Em relação a aplicabilidade das técnicas, tanto o ICP OES quanto o ICP-MS possuem a versatilidade de possibilitar a análise multielementar em uma única medição e por utilizarem uma fonte de aquecimento, como o plasma, podem ser aplicadas ao estudo de amostras das mais diversas origens como solo, amostras metalúrgicas, agrícolas, alimentos, produtos petrolíferos, materiais biológicos e fármacos (KRUG, 2016).

Outra técnica da espectrometria é a de absorção atômica. O equipamento permite a análise quantitativa de elementos presentes em soluções líquidas, gasosas e sólidas. Os componentes básicos de um espectrômetro incluem fonte de radiação, sistema de atomização, conjunto monocromador, detector e processador. Nos equipamentos mais antigos utilizam-se

moduladores mecânicos (*chopper*), nos mais modernos a modulação é feita eletrônica ou mecanicamente. A atomização pode ser feita em chama, em tubo aquecido acoplado a um sistema gerador de hidretos, em sistema de geração de vapor a frio, e eletrotermicamente em forno de grafite, ou outros sistemas alternativos (KRUG, 2016).

Seguindo o mesmo contexto, a espectrometria de fluorescência de raios-X (FRX) é uma técnica nuclear e baseia-se no princípio de que a absorção de raios-X por parte do material provoca a excitação dos átomos, que emitem radiação secundária denominada fluorescência de raios-X (SANTOS, 2013). A técnica baseada na dispersão por comprimento de onda (WDXRF) necessita de um movimento em conjunto e preciso entre o cristal difrator e o detector, encarecendo o sistema (JENKINS et al., 1981). A função dos cristais é difratar a radiação fluorescente emitida pela amostra. Os detectores de raios-X têm a função de converter a energia dos fótons emitidos pela amostra em pulsos elétricos. Os detectores utilizam um processo de fotoionização onde a interação entre a energia dos fótons e o material do detector produz certo número de elétrons. A corrente produzida é convertida em pulsos por um capacitor e um resistor, de forma que um pulso é produzido para cada fóton. No WDXRF, o detector capta as linhas características que foram separadas pelo cristal analisador (IPEN, 2006).

Os comprimentos de onda emitidos são bem definidos para cada elemento químico, o que permite identificar elementos com número atômico de 11 a 92 (do Na ao U) em amostras de composição desconhecida e determinar suas quantidades relativas através da comparação com amostras padrão (PICCOLI *et al.*, 2006).

A FRX conquistou papel de fundamental importância na pesquisa, desenvolvimento e análise de materiais desde a sua descoberta. Este método hoje em dia está muito bem consolidado, sendo considerado um procedimento padrão, indispensável na caracterização de todos os tipos de materiais. Os instrumentos de fluorescência de raios-X modernos são capazes de produzir análises quantitativas de materiais complexos com precisão que iguala ou excede aquela dos métodos clássicos ou outros métodos instrumentais. Para uma precisão adequada das análises, porém, esta técnica requer a disponibilidade de padrões de calibração que se aproximem da composição e características físicas das amostras, ou métodos matemáticos satisfatórios para lidar com efeitos interelementares (SKOOG *et al.*, 2002). A tecnologia usada para a separação (dispersão), a identificação e a medição de intensidade de um espectro de

fluorescência de raios-X da amostra dá origem a dois tipos principais de espectrômetros: sistemas de dispersão por comprimento de onda (WD-XRF) e de energia dispersiva. (ED-XRF) com suas variantes. As variantes da técnica EDXRF são:

- (1) a fluorescência de raios-X com reflexão total (TXRF – Total Reflection X-Ray Fluorescence), possuindo vantagens como quantidades mínimas das amostras (da ordem de 5  $\mu$ l) e menores valores de limites de detecção em relação à EDXRF convencional;
- (2) a microfluorescência de raios-X ( $\mu$ -XRF). Nestas técnicas, normalmente se utiliza raios-X de elementos alvo (Mo e Rh) de um tubo de raios-X, e mais recentemente raios-X da luz síncrotron. (SILVA, 2004).

Na Figura 2 estão demonstrados os tipos de espectrômetros de fluorescência de raios-X e suas configurações.

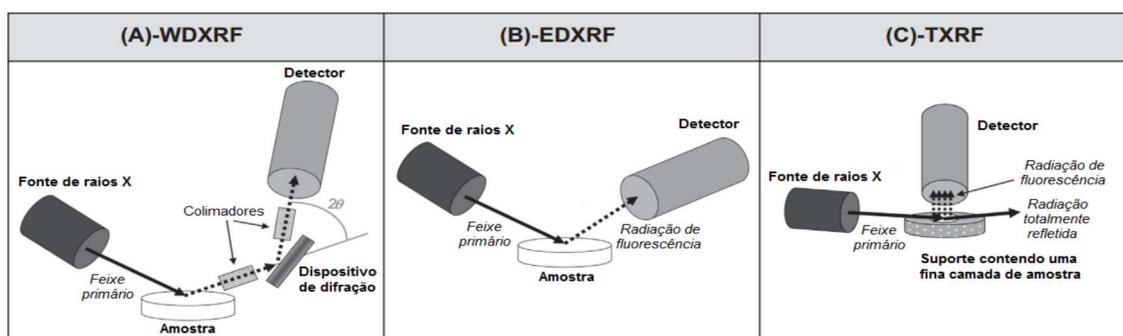


Figura 2: Configurações dos espectrômetros de fluorescência de raios X por (A) dispersão de comprimento de onda, (B) dispersão de energia e (C) reflexão total.

Fonte: Adaptada de Margui et al., 2014

Até 1966, as análises por FRX eram realizadas utilizando apenas a técnica WDXRF, na qual é necessário um equipamento que permita um movimento sincronizado entre o cristal difrator e o detector, a fim de selecionar os raios-X característicos de acordo com seu comprimento de onda, obedecendo à lei de Bragg da difração (MARGUI *et al.*, 2014).

Na técnica analítica EDXRF, os elementos presentes na amostra são iluminados com raios-X (primário) emitindo a radiação de raios-X (secundário) fluorescentes com energias discretas que são característicos para cada elemento. Cada raio-X com energia diferente tem origem em uma transição eletrônica diferente em um átomo do material. Assim, através da

medida das energias da radiação emitidas por uma amostra, é possível determinar quais elementos estão presentes. Por meio das medidas das intensidades da radiação em cada faixa de energias, é possível determinar quanto de cada elemento está presente nas amostras (SKOOG, 2009). Desenvolvimentos tecnológicos recentes, incluindo fontes miniaturizadas, a produção de tubos de microfoco de baixa potência, os novos dispositivos ópticos de raios-X, as janelas de detectores de raios-X de alta transmitância não tóxicas à base de carbono e a melhoria no sinal dos sistemas de detecção tornaram possível estender XRF para a determinação de elementos de baixo  $Z$  e obter informações 2D ou 3D em um nível micrométrico. Da mesma forma, projetos recentes e comercialização de instrumentação de bancada e portátil, que oferecem extrema simplicidade de operação em um projeto de baixo custo, têm promovido ainda mais a abordagem de FRX para muitos problemas analíticos. Durante os últimos quinze anos, o uso de FRX como uma técnica analítica experimental teve um aumento considerável. De acordo com Margui e colaboradores (2014), o número de artigos científicos publicados em revistas indexadas, usando “XRF” e palavras-chave “meio ambiente” por meio da plataforma Scopus, passou de cerca de trinta por ano em 2006 até duzentos em 2020. Esta tendência certamente mostra os avanços instrumentais de FRX nos últimos anos, em que novos recursos analíticos de FRX foram trazidos e inúmeras aplicações ambientais se tornam realidade (MARGUI *et al.*, 2022).

#### **2.4.5 Espectrometria de fluorescência de raios-X por reflexão total**

Como uma variante da EDXRF, a fluorescência de raios X por reflexão total (TXRF – *Total Reflection X-Ray Fluorescence*) foi proposta como técnica analítica por Yoneda & Horiuchi em 1971 e desenvolvida por Aiginger & Wobrauschek a partir de 1975. Knoth & Schwenke (1978) construíram o primeiro instrumento compacto que foi utilizado para análises na década de 80, quando começaram a surgir os primeiros trabalhos. A TXRF surgiu para solucionar principalmente a baixa sensibilidade da EDXRF. Enquanto o ângulo de incidência e o de reflexão são de aproximadamente  $45^\circ/45^\circ$  na EDXRF, na TXRF são de  $0,1^\circ/90^\circ$ , conforme mostrado na Figura 2 (KLOCKENKÄMPER *et al.*, 1996).

Essa diferença na geometria faz com que ocorra a reflexão total dos raios-X. Como o feixe de radiação atinge a amostra com um ângulo muito pequeno, a interação com o substrato é minimizada. A radiação emitida é detectada perpendicularmente e bem próxima à amostra (3

a 5 mm), aumentando a eficiência da detecção dos raios X, uma vez que a razão pico/background é maximizada (NASCIMENTO FILHO, 1999). A TXRF tem potencial para análise simultânea de traços de múltiplos elementos incluindo halogenetos, sendo adequada para vários tipos de amostra e aplicações, por exemplo, líquidos, suspensões, sólidos, filmes finos, filtros para poeiras sedimentáveis.

Além disso a análise requer menores quantidades de amostra, é parcialmente não destrutivo, sendo uma tecnologia robusta, que tem ganhado espaço no mercado. Atualmente, é uma ferramenta de controle de processo em muitas indústrias extrativas e de transformação. Em princípio, o elemento mais leve que pode ser analisado é o berílio ( $Z = 4$ ), mas devido às limitações instrumentais e o baixo rendimento de raios-X para os elementos leves, muitas vezes é difícil de quantificar elementos mais leves do que o sódio ( $Z = 11$ ), a menos que sejam feitas correções de background e correções interelementares muito abrangentes (Manual ARL9900, 2007). As linhas espectrais utilizadas em uma análise química são selecionadas com base na intensidade, na acessibilidade do instrumento, e na menor sobreposição de linha. A preparação da amostra para o TXRF é fundamental para a análise quantitativa e depende do tipo de amostra e seu estado agregado. Devido à sua capacidade de analisar diferentes amostras, o TXRF é adequado para metrologia química em nanoescala, tanto para metais de alto número atômico quanto para elementos leves em análises ambientais e biológicas. Como referência tem-se as normas internacionais, como a “ISO/TS 18507:2015-Surface Chemical Analysis — Use of Total Reflection X-ray Fluorescence spectroscopy in biological and environmental analysis” e a “ISO/FDIS 20289:2017(E) INTERNATIONAL STANDARD I Surface Chemical Analysis — Total reflection X-ray fluorescence analysis of water” comprovando a consolidação dessa técnica por meio de sua utilização nos laboratórios certificados.

Na Figura 3 está ilustrado o espectrômetro de fluorescência de raios-X por reflexão total utilizado nesse trabalho.



Figura 3: Espectrômetro de fluorescência de raios de reflexão total, PICOFOX.

Fonte: BRUKER, 2012

As principais vantagens do TXRF são:

- a) determinação simultânea de traços de múltiplos elementos incluindo halogênios;
- b) análise de quantidades de amostra muito pequenas (inferior a microgramas dependendo da preparação e condição da amostra);
- c) quantificação simples usando padrão interno e possibilidade de quantificação livre de interferência;
- d) adequado para vários tipos de amostras e aplicações;
- e) efeitos de matriz ou memória teoricamente baixos;
- f) é necessário um tempo relativamente curto para a coleta das medições;
- g) alta sensibilidade e baixos limites de detecção dependendo da matriz da amostra (elementos), método de preparação, e instrumentação.(ISO/TS 18507:2015)

No equipamento TXRF, o feixe monocromático de raios-X colide com a amostra em ângulo muito pequeno, causando reflexão total do feixe. O ângulo do feixe incidente deve estar abaixo do ângulo crítico de reflexão total dos raios-X (Figura 4), diferentemente de outras geometrias da técnica de fluorescência de raios-X, onde tanto o feixe e o ângulo de detecção são de 45° (BRUKER, 2012)

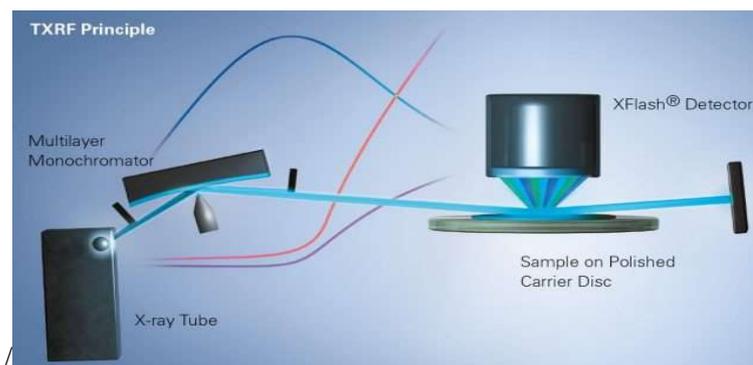


Figura 4: Configuração de uma fluorescência por reflexão total, com incidência, reflexão do raios-X sobre a amostra e posição do detector.

Fonte: BRUKER, 2012

O TXRF utiliza um monocromador multicamada com a função de gerar um feixe fino que incide sobre a amostra com um ângulo muito pequeno, para maior rendimento de fluorescência e ruído reduzido, esse dispositivo permite a análise elementar de traços (BRUKER, 2012). Como as técnicas convencionais de energia dispersiva de XRF, a excitação pelo feixe de raios-X faz com que os elementos da amostra emitam luz em suas energias características, o que permite a identificação elementar. A magnitude dos sinais de energia dos elementos ajuda a determinar sua concentração em uma amostra. No entanto, a capacidade do TXRF de iluminar uma amostra com um feixe totalmente refletido reduz a absorção e a dispersão na matriz da amostra. Os benefícios resultantes incluem rendimento de fluorescência significativamente aprimorado, ruído de fundo amplamente reduzido e, conseqüentemente, sensibilidades muito mais altas a elementos que ocorrem apenas em quantidades mínimas. (BRUKER, 2012)

No TXRF ocorre a excitação dupla da amostra, por ambos os feixes primário e refletido, levando a uma duplicação na intensidade de fluorescência, sendo seu diferencial. Nesse contexto, comprovou-se que os LD's para o TXRF são menores que para a fluorescência convencional, isso é devido a três fatores: baixa intensidade do background sob os picos característicos, fluxo da radiação primária disponível para a excitação da amostra é mais efetivo e a proximidade entre a amostra e o detector de raios-X. O LDi (contagem) para cada elemento  $i$  está diretamente relacionado com a intensidade do background (contagem) sob o pico desse elemento (NASCIMENTO, 1999).

O TXRF pode ser usado para realizar análises qualitativas e quantitativas de múltiplos elementos. Para análises quantitativas, um padrão interno, ou seja, um elemento ausente na amostra (por exemplo, V, Sc, Ga, Ge, Se, Y ou Co), é adicionado à alíquota da amostra. Este elemento químico usado como padrão interno terá a função de corrigir por meio da normalização, das instabilidades do sistema e de erros operacionais (NASCIMENTO FILHO, 1999).

A norma citada no item 2.4.2 estabelece que a padronização interna é uma das estratégias mais utilizadas para fins de quantificação na análise TXRF e baseia-se na adição de uma quantidade definida de padrão monoelementar líquido na amostra. Para selecionar o padrão interno e sua concentração, deve-se verificar as condições:

- a) O padrão interno não pode estar presente na amostra, geralmente Ga, Co, V, Y ou algum outro elemento terra rara são usados;
- b) As linhas de fluorescência do padrão interno não devem interferir nos elementos a serem identificados e quantificados;
- c) A concentração do padrão interno deve estar na faixa de concentração média dos elementos a serem quantificados.

A quantificação é realizada por meio da sensibilidade relativa do padrão interno específico para a aplicação, a concentração do analito será calculada pela Equação 1.

$$C_X = \frac{I_X S_S}{I_S S_X} C_S \quad (1)$$

Onde:

$C_X$  é a concentração do analito;

$I_X$  e  $I_S$  são as intensidades líquidas dos picos do analito e padrão interno, respectivamente;

$S_X$  e  $S_S$  são as sensibilidades relativas do analito e padrão interno, respectivamente;

$C_S$  é a concentração nominal do padrão interno.

O cálculo para o limite de detecção no TXRF é calculado por meio da Equação 2.

$$LD_i = \frac{3 C_i \sqrt{N_{BG}}}{N_i}$$

(2)

Onde:

$C_i$  é a concentração do analito;

$N_i$  é a área do pico de fluorescência;

$N_{BG}$  é a área do background.

Com relação ao porta amostra, comumente, utiliza-se discos com diâmetro de 30 mm e 3 mm de espessura e eles devem ser selecionados de acordo com o objetivo do estudo realizado, podendo ser feitos de quartzo, carbono vítreo, safira ou acrílico. Devido ao menor custo em relação aos outros (safira e carbono vítreo) também por apresentar um dos menores ruídos de fundo, o material preferivelmente utilizado é o vidro de quartzo. (DE LA CALLE *et al.*, 2013b). Para utilizar esses discos, no entanto, é necessário realizar uma etapa de hidrofobização pela adição de 1-25  $\mu\text{L}$  (geralmente 10  $\mu\text{L}$ ) de solução de silicone em isopropanol, seguida de sua secagem em estufa por 30 minutos e temperatura de 80°C. Realiza-se esse procedimento para evitar o espalhamento da gota da amostra. Além disso, o porta amostra deve ser descontaminado usando-se detergente neutro e ácido nítrico. O preparo dos discos está ilustrado na Figura 5 (MISRA & SINGH MUDHER, 2002)

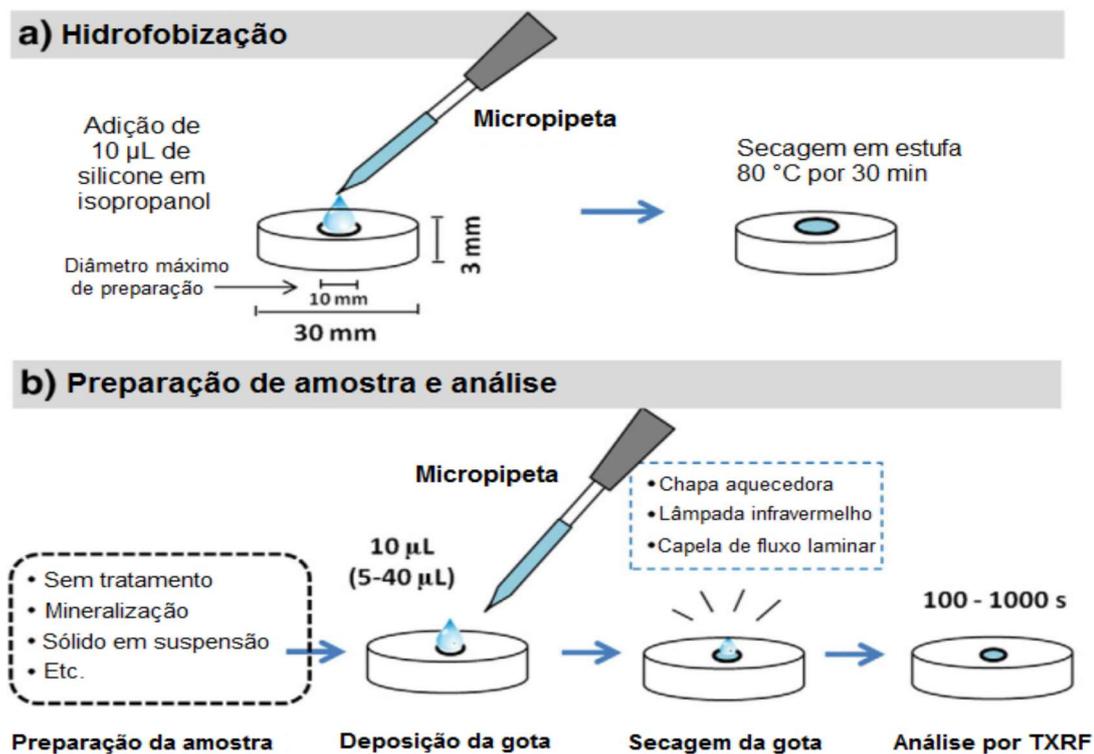


Figura 5: Etapas de preparo dos discos de quartzo para análises por TXRF.

Fonte: ROCHA, 2015

O desenvolvimento de preparo de amostra específico para determinadas matrizes na utilização do TXRF é essencial. O TXRF analisa líquidos, pós e suspensões, que são preparados no suporte de amostra polido como um filme fino para análise quantitativa ou como um microfragmento para análise qualitativa. Para líquidos, alguns microlitros de amostra homogênea com um padrão interno são pipetados no suporte de amostra, secos por calor ou vácuo e carregados no espectrômetro. Sólidos como tecido vegetal e amostras de solo são primeiro secos, moídos, suspensos em solução detergente, diluídos e homogeneizados antes de serem pipetados no transportador. Pós, sedimentos ou outros sólidos podem ser digeridos em uma solução ácida suave ou convertidos em uma suspensão antes de pipetar no transportador. Alternativamente, micropartículas (1-100  $\mu\text{m}$ ) de amostras secas podem ser aplicadas no transportador com graxa para análise semiquantitativa (BRUKER, 2019). A Figura 6 ilustra a gota de uma suspensão sendo aplicada no porta amostra de quartzo.

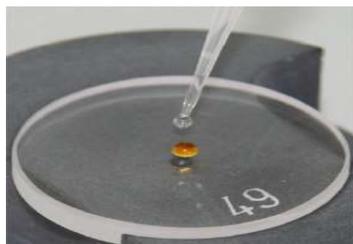


Figura 6: Aplicação da amostra formando um filme fino de amostra sobre o disco.

Fonte: BRUKER, 2012

A norma ISO/TS 18507:2015-Surface chemical analysis cita que o sinal analítico é a taxa de contagem da emissão característica do elemento. Para determinar o taxa de contagem, a área líquida dos picos de emissão característicos deve ser calculadas a partir do espectro, por procedimentos de ajuste, usando o software adequado. A intensidade líquida é calculada subtraindo a radiação de fundo e considerando a sobreposição da linha, possivelmente devido à presença de picos pertencentes a outros elementos, picos de escape ou picos de empilhamento. A preparação da camada fina é crucial para obter resultados quantitativos confiáveis.

Essa mesma norma diz que o *software* tem disponível métodos de correção de fundo, utilizando métodos matemáticos de filtragem digital para o espectro medido e a transformada de *Fourier*. Importante ressaltar, que a Transformada de *Fourier* possui uma aplicação para analisar a frequência contida em sinais contínuos. A Transformada de *Fourier* Discreta (*Discrete Fourier Transform – DFT*) é utilizada para analisar frequências contidas num sinal digital. Nesta operação, as frequências de *Fourier* baixas e altas são filtradas e as frequências de *Fourier* médias são tomadas como o espectro corrigido de fundo. Obtendo um espectro na forma de onda como ilustrado na Figura 7. Métodos alternativos consistem em subtrair do espectro a curva de fundo aproximada calculada selecionando alguns pontos no espectro.

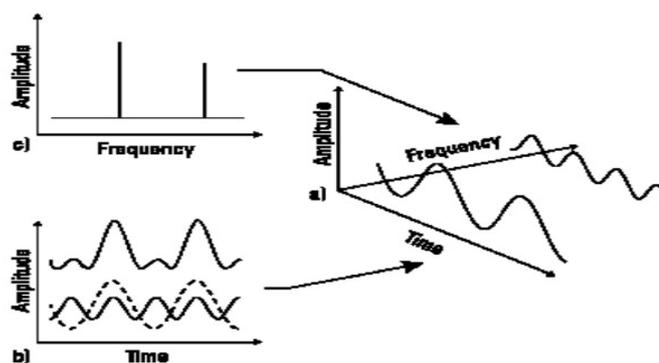


Figura 7: Frequências de *Fourier* baixas e altas filtradas e as frequências de *Fourier* médias tomadas como o espectro corrigido de fundo.

Fonte: ISO/TS 18507:2015-Surface Chemical analysis

#### 2.4.6 Exemplos de aplicações do TXRF

Para exemplificar a aplicabilidade da técnica TXRF comparada ao ICP-MS, um estudo demonstrou a determinação de metais em amostras de biópsia hepática humana percutânea, sendo que foram coletadas amostras de 52 indivíduos e foram analisados por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado e um espectrômetro de reflexão total. A exatidão/precisão foi testada pela análise de Material de referência certificado pelo NIST 1577a *Bovine Liver* e as concentrações de Fe, Cu, Zn e Rb determinadas em humanos nas amostras de biópsia hepática estavam em boa concordância, como mostrado na Tabela 03. Os resultados evidenciam que a técnica de TXRF é adequada para análise de amostras de biópsia, as quais utilizam pequena massa e para determinação simultânea de metais e metaloides (VARGA *et al*; 2005).

Tabela 3: Valores das concentrações de MRC NIST 1577a diante das duas técnicas analíticas.

	Valores certificados $\pm$ faixa certificada ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	ICP-MS valor $\pm$ desvio padrão ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	TXRF valor $\pm$ desvio padrão ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
Na	2430 $\pm$ 130	2280 $\pm$ 192	-
Mg	600 $\pm$ 15	595 $\pm$ 35	-
K	9260 $\pm$ 70	-	11300 $\pm$ 830
Ca	120 $\pm$ 7	126 $\pm$ 14	-
Mn	9,9 $\pm$ 0,8	9,6 $\pm$ 1,1	11,8 $\pm$ 0,9
Fe	194 $\pm$ 20	184 $\pm$ 14	193 $\pm$ 14
Co	0,21 $\pm$ 0,05	0,23 $\pm$ 0,09	-
Ni	a	0,77 $\pm$ 0,14	n.d.
Cu	158 $\pm$ 7	148 $\pm$ 10	156 $\pm$ 11
Zn	123 $\pm$ 8	125 $\pm$ 8	127 $\pm$ 9
Rb	12,5 $\pm$ 0,1	13,2 $\pm$ 0,6	11,9 $\pm$ 0,8
Pb	0,135 $\pm$ 0,015	0,126 $\pm$ 0,015	n.d.

Fonte: Adaptado de VARGA et al., 2005

\*a= Nenhum valor de referência fornecido

n.d. = Não determinado

Outro importante trabalho publicado de desenvolvimento no TXRF foi a determinação dos analitos Na, Mg, Al, K, Ca, Ti, V, Cr, Mn, Ni, Cu, Zn, Rb, Sr, Ba e Pb em amostras de vidro de *smartphones* empregando suspensão, sendo esse tipo de matriz composta por elementos majoritários e outros a nível de traços (COSTA *et al.*, 2022).

O Laboratório de Pesquisas Forenses Nucleares (LANAFONU, sigla em espanhol) do México, é um Laboratório com o objetivo de otimizar processos e técnicas científicas usadas para analisar materiais, fontes ambientais e biológicas por TXRF. O LANAFONU foi credenciado em 2019, como Laboratório de Pesquisa pelo organismo de acreditação mexicano. A implementação do sistema de qualidade e acreditação permitiu uma melhoria significativa das competências dos colaboradores na utilização da técnica do TXRF.

Dessa forma, a literatura relata muitas aplicações bem-sucedidas de TXRF no meio ambiente e alimentos. Novas aplicações estão surgindo principalmente nas áreas de medicina, biologia, farmacologia e nanotecnologia.

#### 2.4.7 Validação de métodos

Uma vasta literatura está disponível para apoiar o processo de garantia da qualidade e validação de um método analítico dividida nas áreas mais amplas, incluindo: ABNT NBR ISO / IEC 17025, que trata dos requisitos gerais de competência dos laboratórios de calibração e ensaio; INMETRO DOQ-CGCRE-008: Diretrizes para Validação de métodos Analíticos; EURACHEM: adequação dos métodos analíticos; ou ANVISA: resolução 899 de 29 de maio de 2003 (MELO, 2020).

O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), é o órgão responsável por regulamentar os procedimentos de validação aplicados para produtos de origem animal, como carnes, ovos, queijos, etc. (MAPA, 2015). Dentro do escopo de analitos tem-se resíduos de medicamentos de uso veterinário e contaminantes potencialmente presentes na alimentação animal, como os metais tóxicos. A validação de procedimentos analíticos visa garantir a qualidade metrológica dos resultados analíticos e fornecer rastreabilidade, comparabilidade e confiabilidade (MAPA, 2015).

A validação de métodos analíticos determina o desempenho característico de um método ou equipamento, partindo-se da avaliação de parâmetros como exatidão, precisão, robustez, seletividade, linearidade e faixa de trabalho, limites de detecção e quantificação, variações intra-laboratoriais e inter-laboratoriais. Nem todas as validações contemplam todas as figuras de mérito citadas, podendo sofrer alterações nos procedimentos de validação, isso irá depender do tipo de especificidade de determinados métodos de ensaio e peculiaridades do laboratório (MAPA, 2011).

O limite de detecção (LD) é a menor concentração de analito em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob certas condições experimentais. Existem muitos critérios para definir os limites de detecção. O critério de aceitação para algumas técnicas instrumentais de análise é a relação sinal-ruído de 3:1 (INMETRO, 2016).

O limite de quantificação (LQ) do método analítico é a menor concentração do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão admissíveis sob determinadas condições experimentais. É calculado como a concentração do analito em uma relação sinal-ruído de 10:1 (INMETRO, 2016).

Para a exatidão, determina-se a proximidade entre os valores reais e os obtidos experimentalmente empregando-se a análise de materiais de referência certificados (MRC) na matriz ou ensaios de adição e recuperação (MAPA, 2011).

Na precisão do método, para repetitividade o que se determina é o grau de concordância entre os resultados obtidos nas mesmas condições operacionais (mesmo analista, mesmo equipamento, etc.) no menor intervalo de tempo possível. Já para avaliação da precisão intermediária, uma ou mais das condições de análise deve ser variada, tais como dia, analista e/ou equipamento, dependendo da rotina do laboratório. Pode ser utilizado Material de Referência, amostra de rotina ou amostra fortificada. (MAPA, 2011). A precisão em termos de repetitividade pode ser determinada utilizando-se os mesmos ensaios de recuperação realizados para exatidão e é expressa pelo coeficiente de variação.

Por fim, a robustez verifica como o desempenho do método pode ser afetado por pequenas variações rotineiras. Desta forma, avalia-se os fatores que possam prejudicar a qualidade dos resultados. Esses fatores são, geralmente, identificados durante o desenvolvimento do método e sua influência sobre o desempenho é avaliada com emprego de testes de robustez. Esses fatores devem ser criteriosamente escolhidos para a correta avaliação da robustez, de tal forma que seja possível identificar as variáveis que podem afetar significativamente o desempenho do método e, ao mesmo tempo, garantir que essas estejam sob controle durante o emprego do método. Um método bem estabelecido para testar a robustez é conhecido como teste de *Youden* e é descrito pela *AOAC* (YOUTDEN, 1975).

Considerando o contexto deste trabalho, o Manual da Garantia da Qualidade do MAPA foi utilizado como guia para o processo de validação.

Diante dos temas discutidos nesse trabalho, a escolha do preparo da amostra juntamente com a técnica instrumental para as determinações analíticas, devem ser escolhidos de acordo com o objetivo desejado, as espécies a serem determinadas, equipamentos disponíveis, custo/benefício, frequência analítica, entre outros fatores. Dessa forma, todos esses aspectos demonstram a complexidade das tarefas envolvidas em uma análise química e o grau de especialização requerido para planejá-las e executá-las com sucesso e confiabilidade (KRUG, 2019).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Desenvolver um método analítico para determinação de metais e metaloides em amostras de fígado bovino *in natura* utilizando a técnica TXRF.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Estudar as potencialidades da técnica TXRF para determinação dos metais e metaloides: Al, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Rb, Sr, Nb, Cd, Ba, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Yb, Lu, Hg, Pb, Th e U em fígado bovino *in natura* por TXRF;
- Otimizar o procedimento de preparo de amostra baseado na extração ácida em ultraturrax;
- Validar o método desenvolvido para a determinação de metais e metaloides em fígado bovino *in natura* por TXRF para os metais que atenderem as condições dos parâmetros de desempenho do método;
- Determinar os metais e metaloides nas amostras de fígado da rede comercial utilizando a metodologia estabelecida;
- Comparar os resultados obtidos com outras técnicas analíticas.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Instrumentação e materiais

- Agitador Vortex (KASVI);
- Triturador ULTRA-TURRAX® Tube Drive UTTD com 10 bolinhas de vidro, marca IKA;
- Balança analítica (Mettler-Toledo);
- Chapa de aquecimento, marca: QUIMIS;
- Forno mufla para aquecimento, marca: JUNG;
- Discos de quartzo de 30 mm de diâmetro e uma espessura de  $3,0 \pm 0,1$  mm (Bruker);
- Dessecador;
- Espectrômetro de Fluorescência de Raios-X por Reflexão Total, modelo: S2 PICOFOX (Bruker), Berlim, Alemanha;
- Purificador de Água PURELAB Flex 3 Veolia/ELGA
- Repipetador automático (BRAND);
- Estufa com circulação de ar (Tecnal);
- Micropipetas de volumes ajustáveis calibradas (1000-5000  $\mu\text{L}$ , 200-1000  $\mu\text{L}$ , 20-200  $\mu\text{L}$ , 10100  $\mu\text{L}$  e 2- 20  $\mu\text{L}$ , diferentes marcas);
- Purificador de ácidos, marca *Milestone*, modelo *DuoPUR Subboiling Destillation System*;
- Mini geladeira *Black & Decker* para viagem, 12V;
- Tubos de centrífuga de polipropileno graduados com capacidade de 15,0 e 50,0 mL;
- Tubos *Eppendorf* de 1,5 mL;
- *Notebook e software Spectra Picofox*;
- Faca de cerâmica.

### 4.2 Padrões, reagentes e soluções:

- Ácido nítrico concentrado,  $\text{HNO}_3$  65% m/v,  $d = 1,4$  g/mL, marca Merck;
- Ácido nítrico concentrado sub-destilado;
- Água Milli-Q;

- Amostra de referência certificada SRM 1577c-NIST-*Bovine Liver*;
- Solução de silicone em isopropanol (Serva);
- Acetona pura, C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O P.A., marca VETEC;
- Detergente neutro (Extran);
- Solução padrão de gálio MRC 1 g/L (Assurance);
- Soluções padrão monoelementares para cada metal 1g/L (cobalto, estrôncio, mercúrio, nióbio, titânio, selênio, tório, rubídio) (Inorganic Ventures);
- Solução padrão multielementar 1g/L (alumínio, arsênio, bário, cádmio, cromo, cobre, ferro, manganês, níquel, chumbo, urânio, vanádio, zinco) (Inorganic Ventures);
- Solução padrão multielementar 1g/L (Cério, lantânio, praseodímio, neodímio, európio, gadolínio, disprósio, telúrio, térbio, samário, lutécio, itérbio, hólmio) (Inorganic Ventures).

#### **4.2 Especificações e condições instrumentais do espectrômetro de fluorescência de raios X por reflexão total-Picofox**

- a) Fonte de raios X : tubo Molibdênio de ânodo;
- b) Voltagem aplicada à fonte de raios X: 50 kV;
- c) Corrente aplicada à fonte de raios X : 1000  $\mu$ A;
- d) Ângulo de incidência usado: 0,60°;
- e) Área do detector: 1 cm<sup>2</sup>;
- f) Resolução de energia:<150 eV em 100kcps;
- g) Detector: *Silicon-drift detector*;
- h) Atmosfera: Ar

### 4.3 Procedimentos experimentais

#### 4.3.1 Coleta, etapas preliminares e acondicionamento das amostras

As amostras de fígado bovino utilizadas nesse trabalho foram adquiridas na rede comercial, durante os anos de 2021 e 2022, nas cidades de Belo Horizonte, Contagem, Cataguases, Barbacena e Rio Pomba, seguindo o protocolo de amostragem do MAPA, descrito em Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes (MAPA, 2011). Cada amostra com peso de 200 g, a fim de garantir uma boa representatividade, todo o conteúdo do fígado foi picado, homogeneizado e armazenado em frasco hermeticamente fechado e mantido sob refrigeração para inibir a decomposição, sendo posteriormente armazenados e acondicionados em um freezer, a temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ , conforme Figura 8.



Figura 8: Etapas preliminares do preparo da amostra a) fígado bovino *in natura* b) corte e quarteamento do fígado c) Fígado homogeneizado.

Fonte: O próprio autor

#### 4.3.2 Limpeza e descontaminação do material

Todos os materiais, a exemplo vidrarias e demais utensílios utilizados nas análises foram previamente lavados (detergente neutro, por 24h) e descontaminados ( $\text{HNO}_3$  10% v.v<sup>-1</sup>, por 24h), enxaguados três vezes com água destilada, e por fim, uma única vez, com água ultrapura. Também, a limpeza dos discos de quartzo seguiu protocolos de limpeza sugerido pelo fabricante, conforme orientação abaixo, na Figura 9.

	<p>Limpeza por meio de um algodão embebido em acetona do disco de quartzo</p>
	<p>Suporte para posicionamento dos discos no carrossel de teflon</p>
	<p>O suporte contendo os disco foi imerso em um béquer contendo a solução de limpeza (5% detergente alcalino) e esta aquecida por 5 min em chapa elétrica quente sem ebulição. Em seguida, enxaguados com água deionizada.</p>
	<p>Os discos foram imersos em solução de HNO<sub>3</sub> 10% e a solução aquecida durante 2h, sem ebulição ou permaneceram no banho por 24 h sem aquecimento. Em seguida, foram enxaguados com água deionizada em abundância</p>
	<p>Secagem em estufa a temperatura de 60°C por 30 minutos</p>
	<p>Hidrofobização com 10 µL de silicone em isopropanol</p>
	<p>Secagem em estufa dos discos hidrofobizados a temperatura de 60°C por 30 minutos</p>

Figura 9: Descrição de procedimento para limpeza dos discos de quartzo.

Fonte: Fotos extraídas do manual de operação PICOFOX, BRUKER, 2012.

### 4.3.3 Preparo das soluções fortificadoras e padrão interno

As soluções foram preparadas contendo os analitos (Al, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Rb, Sr, Nb, Cd, Ba, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Yb, Lu, Hg, Pb, Th e U) nas concentrações de  $37,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $200 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$  partindo de soluções MRC multielementares e monoelementares de  $1000 \text{mg L}^{-1}$  e como soluções intermediárias as concentrações de  $50 \text{mg L}^{-1}$ ,  $10 \text{mg L}^{-1}$ ,  $1 \text{mg L}^{-1}$  com adição ácido nítrico *sub-boiling* 40% v v<sup>-1</sup> e água tipo I, com auxílio de pipetas e micropipetas. O mesmo procedimento foi adotado para o preparo da solução do padrão interno Ga. As soluções preparadas que não foram utilizadas imediatamente, foram armazenadas em refrigerador. O MAPA sugere que as soluções devem ser devidamente rotuladas e datadas, acondicionadas em recipientes adequados e hermeticamente fechados, para evitar perdas de solventes voláteis e contaminações, e armazenadas à temperatura adequada entre 10°C e -18°C.

### 4.3.4 Preparo das soluções ácidas

O ácido nítrico utilizado passou por processo de purificação através da destilação abaixo do seu ponto de ebulição, ou seja, em temperatura de sub-ebulição (*sub-boiling*). A alta pureza do líquido destilado é alcançada pela evaporação do líquido à baixas temperaturas, o que diminui o arraste de contaminantes inorgânicos juntos com o vapor do ácido. As soluções de HNO<sub>3</sub> foram preparadas em tubos *Corning*® de 50 mL, adicionando-se os volumes de HNO<sub>3</sub> concentrado destilado em cerca de 20 mL de água e completando o volume para 50 mL com água ultrapura. Nesse trabalho utilizou-se várias concentrações da solução de HNO<sub>3</sub>: 5%, 10% e 15% v v<sup>-1</sup>.

### 4.3.5 Higiene e segurança

As bancadas foram higienizadas com álcool 70% antes e depois de realizar os experimentos. Equipamentos de proteção individual (EPIs) e coletiva (EPCs) necessários para a execução dos ensaios foram utilizados, como luvas para procedimento sem talco, avental, sapatos fechados, óculos de proteção e capela de exaustão.

#### 4.3.6 Preparo das amostras empregando moagem ácida

A moagem da amostra foi utilizada com o objetivo de reduzir o tamanho médio das partículas da amostra sólida pela aplicação de forças de impacto, compressão e abrasão, melhorando a homogeneização e a eficiência de extração. Dessa forma, foi proposto um procedimento de trituração e extração em solução ácida da amostra de fígado em uma única etapa.

Para otimização do procedimento, o planejamento de experimentos foi utilizado, visando diminuir o número de experimentos e tempo necessário para a otimização. Em todas os ensaios, utilizou-se sempre a mesma massa de fígado bovino fresco para os testes experimentais. Assim, uma massa representativa de 2,0000 g, referente a uma porção do conteúdo picado e homogeneizado em uma tábua de polipropileno, foi pesada em balança analítica com precisão de 0,1mg e transferida para o copo do dispersor do triturador Ultraturrax, em seguida adicionou-se a solução de HNO<sub>3</sub>, sendo variados em cada experimento os volumes e a concentração dessas soluções ácidas. Ao mesmo copo foi adicionada a solução com os metais e metaloides V, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Ba, Pb e U nas etapas de fortificação, sendo a concentração adicionada de 20 mg kg<sup>-1</sup> para os experimentos em que foram utilizados a fortificação. Desta forma, o copo com a massa de fígado mais a solução ácida e 10 bolinhas de vidro foram acoplados ao triturador Ultraturrax iniciando-se a moagem ácida. Vale ressaltar, que nas etapas de fortificação com o material de referência certificado, o volume da solução fortificadora foi adicionado na etapa da moagem.

As variáveis avaliadas foram o volume, a concentração de HNO<sub>3</sub> e o tempo de moagem para uma massa fixa de fígado bovino conforme exposto na Tabela 4.

Tabela 4: Condição de cada ensaio do planejamento fatorial fracionário 2<sup>3-1</sup> para o procedimento de preparo de amostra.

Ensaio	Concentração HNO <sub>3</sub> (% v v <sup>-1</sup> )	Volume de HNO <sub>3</sub> (mL)	Tempo (minutos)
1	15	8	15
2	15	4	9
3	5	8	9
4	5	4	15
5	10	6	12

Ensaio	Concentração HNO <sub>3</sub> (% v v <sup>-1</sup> )	Volume de HNO <sub>3</sub> (mL)	Tempo (minutos)
6	10	6	12
7	10	6	12

A Figura 10 ilustra as etapas do preparo da amostra.



Figura 10: Etapas iniciais do preparo da amostra: a) amostra picada com faca de cerâmica; b) pesagem da amostra; c) trituração da amostra em meio ácido no Ultraturrax.

Fonte: O próprio autor

Após moagem, a mistura foi transferida para um tubo *Corning* de 15 mL, como mostrado na Figura 11.



Figura 11: Suspensão do fígado bovino após moagem em meio ácido.

Fonte: O próprio autor

Na sequência, agitou-se o tubo com a mistura no vórtex e imediatamente com o auxílio de micropipetas, uma massa de 0,1 g de amostra, 0,8 g de água ultrapura e 0,1 g padrão interno de Gálio na concentração de  $10 \text{ mg.L}^{-1}$ , foram adicionados em um microtubo de 1 mL.

Após a agitação em vórtex do tubo e , pipetou-se  $10 \mu\text{L}$  da suspensão, e aplicou-se em discos de quartzo (previamente limpos e hidrofobizados com uma solução de silicone em isopropanol), e esse conjunto de amostra e disco foi aquecido em estufa a temperatura de  $60^\circ\text{C}$ , durante 30 minutos, conforme Figura 12. Nesta etapa final, formou-se um filme homogêneo de amostra sobre o disco com espessura  $< 100 \mu\text{m}$  e diâmetro do filme de amostra  $< 10 \text{ mm}$ . As medidas foram realizadas por um tempo de 500 s usando o TXRF, equipado com um tubo de raios-X de potência de 50 W, com alvo Mo. Para avaliação dos espectros obtidos foi utilizado o *Software Spectra PicoFox* (7.2.5.0, Bruker Nano GmbH).

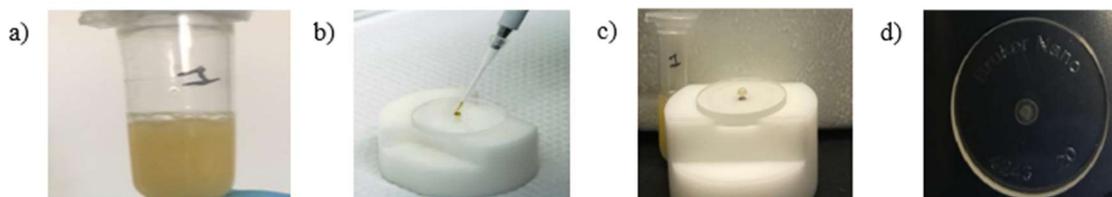


Figura 12: Etapas finais do preparo da amostra, sendo: a) suspensão b) aplicação da gota c) gota aplicada no disco d) gota após secagem na estufa

Fonte: O próprio autor

As etapas da sequência analítica estão descritas e ilustradas na Figura 13. A mesma sequência foi utilizada para o preparo da amostra *in natura* de fígado, assim como para o material de referência certificado, o MRC1577c. Para o MRC, calculou-se a massa da amostra seca que corresponde a cerca de 2 g da amostra *in natura*.

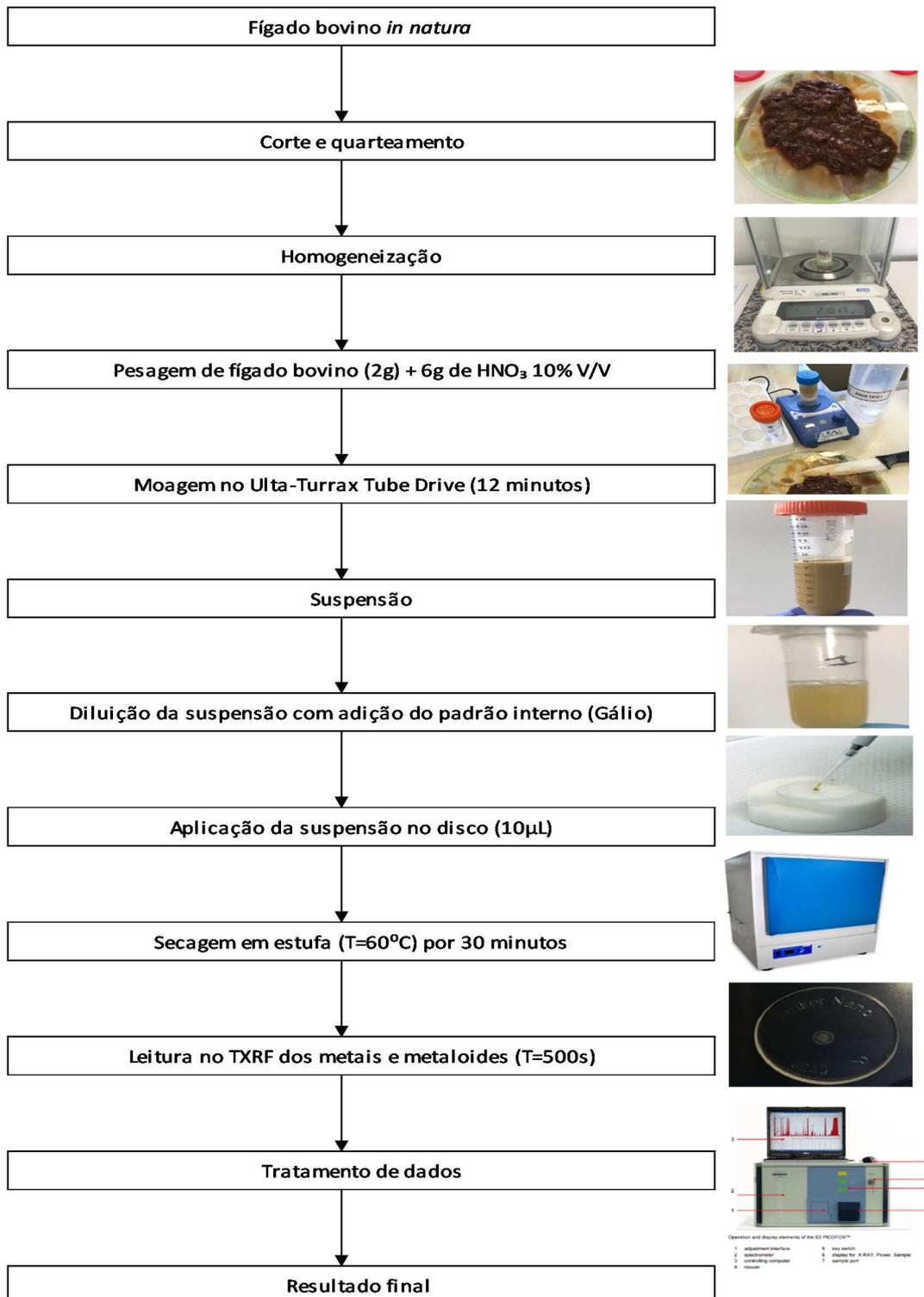


Figura 13: Sequência Analítica do método proposto.

Fonte: O próprio autor.

#### 4.3.7 Determinação do teor de umidade e cinzas ou resíduo mineral fixo

Essa determinação foi realizada para normalizar os teores quando comparados com metodologias nas quais utiliza-se a amostra seca, como no caso dos MRCs e também para conhecer o % do teor de umidade e cinzas da amostra de fígado utilizada nesse estudo. O princípio do método tem por objetivo determinar as cinzas em produtos de origem animal, através de dessecação por método gravimétrico (BRASIL, 2014). A metodologia consistiu em pesar em duplicata uma massa de 5,000 g da amostra de fígado bovino em uma placa de vidro *pirex* e conduzida a um forno do tipo mufla a temperatura de 60°C, até peso constante, obtendo a perda de umidade e posteriormente a 550°C por três horas a perda total (AOAC, 1997). A Figura 14 ilustra as etapas dessa determinação, sendo a amostra em temperatura ambiente, temperatura de 60°C e 550°C.



Figura 14: Etapas da determinação do teor de cinzas do fígado bovino, sendo:

a) fígado *in natura*; b) fígado seco a temperatura de 60°C ; c) cinzas.

Fonte: O próprio autor

#### 4.3.8 Controle de qualidade instrumental

O monitoramento do desempenho do espectrômetro TXRF PICOFOX foi realizado previamente às análises, conforme recomendação do fabricante, sendo os parâmetros de controle de qualidade como a correção de ganho, a resolução espectroscópica, a sensibilidade e a precisão da quantificação. Essas orientações para realizar a otimização estão descritas no manual de operação do equipamento. Neste procedimento, os discos são preparados com o analito específico para cada parâmetro exigido. Vale destacar que alguns elementos aparecem no espectro do TXRF, mesmo não estando presentes nas amostras: o argônio (Ar), elemento inerte e componente do ar está presente internamente no sistema, considerando que a medida não é realizada em vácuo; o silício (Si) que está presente na constituição do disco de quartzo

utilizado como porta amostra e o molibdênio (Mo), que é constituinte do tubo de raios-X do equipamento utilizado.

#### **4.3.9 Parâmetros de validação do método**

O Manual de Garantia da Qualidade Analítica em Resíduos e Contaminantes de Alimentos, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2011) foi utilizado para direcionar os estudos de validação do método, sendo que os parâmetros analisados foram: limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão (repetitividade e precisão intermediária), exatidão e robustez.

##### **4.3.9.1 Limite de detecção e limite de quantificação instrumental**

Nesse trabalho, a estimativa de LD foi fornecida pelo software do equipamento, com base na relação sinal/ruído. A fortificação é importante para não se superestimar os valores de LD e LQ, uma vez que para o branco reagente, o sinal de fundo é normalmente muito baixo.

Os limites de detecção e quantificação foram estimados por meio da análise em replicatas de 7 discos do branco reagente fortificado, contendo água tipo I, solução de ácido nítrico 10% v v<sup>-1</sup>, padrão interno de Ga e solução padrão multielementar na concentração de 37,5 µg L<sup>-1</sup>.

Para confirmação do LQ, analisou-se as mesmas sete replicatas de branco reagente fortificado com 37,5 µg L<sup>-1</sup> dos metais e duas amostras de branco do reagente sem fortificar.

##### **4.3.9.2 Limite de detecção e limite de quantificação para o fígado bovino *in natura***

A estimativa do LD e LQ para amostra de fígado bovino foi realizada nas mesmas condições que no item 4.3.9.1 sendo acrescentado o fígado bovino *in natura* em todas as etapas.

##### **4.3.9.3 Precisão por meio de matriz fortificada-Repetitividade e Precisão Intermediária**

A repetitividade foi feita por meio da análise de sete amostras de fígado bovino fortificado em dois níveis de concentração, sendo o primeiro na concentração de 50 µg L<sup>-1</sup> dos metais e metaloides e o segundo na de 200 µg L<sup>-1</sup>. Vale ressaltar que a fortificação foi feita no momento do preparo da amostra no Ultraturrax. Também, foi realizada a análise de dois brancos de fígado não fortificado com metais a fim de descontar o valor para elementos presentes

naturalmente no fígado da concentração experimental obtida para a amostra fortificada. A intenção foi verificar a variabilidade nos resultados quando as medições são realizadas em um único laboratório por um único analista usando o mesmo equipamento e em um curto intervalo de tempo.

Os experimentos para avaliação da precisão intermediária foram feitos da mesma forma que os da repetitividade, porém, variou-se a analista e o dia de análise.

Os resultados obtidos nos experimentos para avaliação da precisão também foram utilizados para verificar se o método apresenta exatidão adequada (com amostras fortificadas). Calculou-se a % de recuperação para cada nível estudado e o coeficiente de variação (% CV), ou desvio padrão relativo, por meio dos dados da média e desvio padrão.

#### **4.3.9.4 Exatidão por meio de Material de Referência Certificado**

A exatidão também foi avaliada pela análise do material de referência certificado para fígado bovino do *National Institute of Standards & Technology NIST1577c* em triplicata. Sendo esse MRC um material liofilizado, adicionou-se uma massa de água para aproximar ao máximo de uma amostra de fígado bovino fresco. A quantidade de água foi calculada considerando as perdas de umidade do fígado bovino em forno mufla, conforme descrito no item 4.3.7, para determinação do teor de umidade.

Esse experimento foi realizado em triplicata e utilizou-se também o mesmo método descrito para o fígado bovino *in natura*. A suspensão foi adicionada no disco de quartzo também em triplicata. Calculou-se a % de recuperação e seus respectivos desvios padrões. Para veracidade, o manual do MAPA considera a recuperação aceitável se dentro de uma faixa entre 80 e 120%. Nas Tabela 5 e Tabela 6, estão as massas utilizadas no preparo da amostra, sendo que o procedimento utilizado foi o mesmo do fígado bovino *in natura*, ou seja, a quantidade de MRC pesada passou pelo processo da moagem ácida até a adição da gota da suspensão no disco de quartzo, após secagem na estufa, e conduzida para leitura no TXRF, por um tempo de contagem de 500 s.

Tabela 5: Condições de preparo de amostra para o ensaio da exatidão utilizando o MRC-1577c.

	<b>Massa fígado(g)</b>	<b>Massa ácido(g)</b>	<b>Massa água(g)</b>	<b>Replicatas</b>
	0,3988	6,1402	1,6035	A1
MRC-1577c	0,3975	6,1456	1,6102	A2
	0,4002	6,0223	1,6005	A3

Na Tabela 6 está descrita a etapa de diluição da suspensão com a adição do padrão interno.

Tabela 6: Condições para o preparo da suspensão para o ensaio da exatidão utilizando o MRC-1577c.

<b>Aliquota (g)</b>	<b>Massa do PI (g)</b>	<b>Massa de água (g)</b>	<b>Replicatas</b>
0,1009	0,1002	0,8006	A1-1
0,1035	0,1009	0,8025	A2-2
0,1023	0,1012	0,7999	A3-3

#### 4.3.9.5 Robustez

Para a robustez, avaliou-se as condições em que se variou nos 8 experimentos, os 7 parâmetros, aplicando o planejamento experimental fracionário de *Youden* (Youden; Steiner, 1975).

No teste de robustez, analisou-se as amostras na concentração mais baixa do estudo da precisão intermediária, ou seja,  $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  e as condições dos experimentos estão descritas na Tabela 7 e Tabela 8.

Tabela 7: Condição do ensaio para o estudo da robustez.

<b>Nome do fator</b>	<b>Nível baixo</b>	<b>Nível alto</b>
Massa da amostra (g)	1,8	2
Massa de $\text{HNO}_3$ (g)	5	6
Concentração do $\text{HNO}_3$ (%v v <sup>-1</sup> )	9	10
Tempo de moagem (minutos)	10	12
Temperatura da estufa °C	50	60
Tempo de secagem (minutos)	25	30

<b>Nome do fator</b>	<b>Nível baixo</b>	<b>Nível alto</b>
Leitura	Após 24 h	Imediata

Tabela 8: Fatores para o estudo da robustez.

<b>Fatores</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
1	2	2	2	2	1,8	1,8	1,8	1,8
2	6	6	5	5	6	6	5	5
3	10	9	10	9	10	9	10	9
4	12	12	10	10	10	10	12	12
5	60	50	60	50	50	60	50	60
6	30	25	25	30	30	25	25	30
7	imediate	após24 h	após24 h	imediate	após24 h	imediate	imediate	após24 h

De posse dos valores dos efeitos e ou contrastes do planejamento fatorial realizado, verificou-se se algum efeito foi significativo, e maior que três vezes o desvio-padrão da precisão intermediária (no mesmo nível de concentração) sendo esse critério de aceitabilidade sugerido pelo manual do MAPA, 2011.

#### 4.3.10 Aplicabilidade do método

Ao final de todas as etapas de validação, coletou-se no comércio, amostras de fígado bovino em cinco pontos distintos do Estado de Minas Gerais (MG) e essas foram analisadas em triplicata a fim de verificar a aplicabilidade do método proposto.

#### 4.3.11 Comparação com outra técnica analítica

Também, nesse trabalho uma amostra de fígado bovino *in natura* foi enviada para um laboratório e analisada por ICP-MS/MS, para fins de comparação com o método estudado, como exposto na Tabela 9, tanto o preparo da amostra quanto a técnica utilizada foram diferentes nesses experimentos.

Tabela 9: Condições experimentais para determinação de fígado bovino *in natura*.

<b>Técnica</b>	<b>Preparo da amostra</b>	<b>Reagentes</b>
TXRF	Trituração/Extração/suspensão	HNO <sub>3</sub>
ICP-MS/MS	Trituração/Digestão assistida por radiação micro-ondas (MW)	HNO <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Estudos preliminares**

Alguns estudos preliminares foram realizados com o intuito de verificar a melhor estratégia para o preparo das amostras e para a análise de fígado que englobasse elementos tóxicos e nutrientes em uma mesma etapa. A quantidade de metais e metaloides para avaliação seriam 11, entretanto como o TXRF é uma técnica multielementar com muitas possibilidades de investigação, ampliou-se para 34 analitos.

O preparo das amostras foi testado em meio ácido ( $\text{HNO}_3$ ) e alcalino (TMAH), sendo este último rejeitado devido ao seu alto pH, sendo incompatível com as esferas de vidro do triturador ultraturrax durante a etapa de moagem.

Para a análise por TXRF, avaliou-se como padrão interno Ga e Y. Neste caso, como não ocorreu variações expressivas, optou-se pelo Ga, pois o Y é um analito que ocorre em maiores proporções na natureza, sendo assim menos adequado. E também o padrão interno Ga está presente em maior número nas publicações em estudos de TXRF.

Dois diferentes tempos de leitura no equipamento foram avaliados (500 s ou 1000 s), mas não se observou ganhos significativos na recuperação. Assim, optou-se por tempo de leitura de 500 s, pela economia de tubo de raios-X e rapidez nas medidas.

Esses parâmetros foram então fixados na otimização das outras condições do método analítico.

### **5.2 Desenvolvimento e Validação de Método Analítico**

#### **5.2.1 Otimização do método analítico**

Foi realizado um planejamento fatorial fracionário  $2^{3-1}$  com triplicata no ponto central para avaliar o efeito das variáveis (volume de ácido nítrico, concentração de ácido nítrico e tempo de Ultraturrax) na eficiência do preparo da amostra.

Para avaliação dos espectros obtidos foi utilizado o Software Spectra PicoFox (7.2.5.0, Bruker Nano GmbH).

Na Tabela 10 são apresentadas as % de recuperações dos ensaios do planejamento para os analitos quando se utilizou diferentes concentrações e volumes do ácido nítrico, e também o tempo de Ultraturax para a amostra de fígado fresco. Nesses ensaios, as amostras de fígado foram fortificadas com  $20 \text{ mg kg}^{-1}$ , vale ressaltar que o mesmo procedimento foi realizado com a amostra de fígado sem fortificação. Para o cálculo da % recuperação foi utilizada a Equação 3.

$$\text{Recuperação(\%)} = \left( \frac{C1-C2}{C3} \right) X 100 \quad (3)$$

Onde:

C1= Concentração do analito na amostra fortificada

C2= Concentração do analito na amostra não fortificada

C3= Concentração do analito utilizada na fortificação

Tabela 10: Resultado do planejamento fatorial fracionário  $2^{3-1}$  com ponto central para estudar o efeito da concentração e volume da solução extratora e tempo de Ultraturax sobre a porcentagem de recuperação dos elementos certificados.

Ensaio	Concentração $\text{HNO}_3$ (% v v <sup>-1</sup> )	Volume de $\text{HNO}_3$ (mL)	Tempo (minutos)	Recuperação(%)										
				V	Cr	Mn	Fe	Ni	Cu	Zn	As	Ba	Pb	U
1	15	8	15	105	89	85	123	86	114	81	80	81	103	82
2	15	4	9	80	72	95	133	77	78	80	80	72	75	88
3	5	8	9	62	66	67	96	70	82	76	74	62	59	73
4	5	4	15	62	92	63	81	69	72	83	79	89	59	69
5	10	6	12	81	82	82	93	86	87	82	80	89	80	103
6	10	6	12	83	82	83	107	86	85	80	77	79	79	85
7	10	6	12	89	81	82	103	84	88	83	82	87	81	95

A Figura 15 apresenta o *box plot* referente a porcentagem de recuperação no planejamento fracionário  $2^{3-1}$  com ponto central.

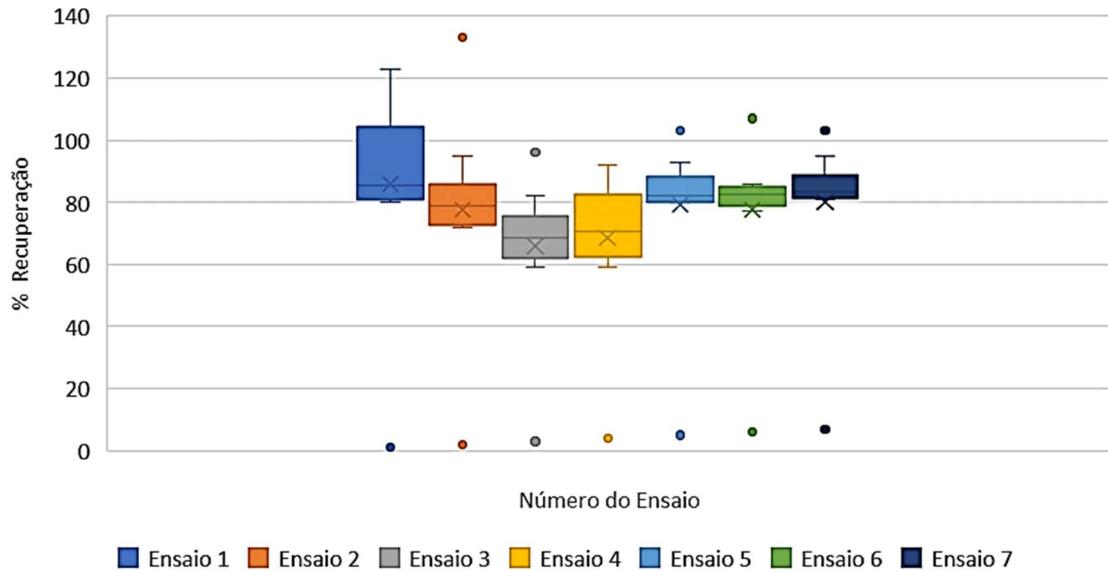


Figura 15: Gráfico referente a % de recuperação no planejamento fatorial fracionário  $2^{3-1}$  com ponto central

Fonte: O próprio autor

Considerando o valor da recuperação sugerido pelo manual do MAPA, 2011 os valores para a taxa de recuperação entre 80 e 120% satisfazem a condição. Dessa forma os ensaios 1, 2, 5, 6 e 7 estão dentro desse critério. Na maior parte dos experimentos, as recuperações de Fe foram maiores que dos outros analitos (com exceção do experimento 1 e 4), aparecendo como um outlier no box plot (Figura 15). Isso pode ser devido à concentração elevada de Fe nas amostras de fígado sem adição, que é bem maior do que a concentração utilizada para fortificação. Como busca-se a condição com recuperações mais próximas de 100% e não a maior recuperação, o erro relativo foi calculado pela Equação 4, em que  $C_e$  é a concentração determinada experimentalmente,  $C_a$  é a concentração da amostra branca e  $C_f$  é a concentração fortificada.

$$\text{Erro relativo (\%)} = \frac{(C_e - C_a) - C_f}{C_f} \times 100 \quad (4)$$

O erro relativo é apresentado na Tabela 11, onde observa-se que a os mesmos ensaios (1, 2 e ponto central), como os mais adequados para o preparo da amostra.

Tabela 11: % Erro relativo obtido para os experimentos do planejamento fatorial fracionário empregado para otimização do preparo das amostras.

Elemento	Exp1	Exp2	Exp3	Exp4	Exp5	Exp6	Exp7
V	5	20	38	38	19	17	11
Cr	11	28	34	8	18	18	19
Mn	15	25	33	37	18	17	18
Fe	23	23	4	19	7	7	3
Ni	14	23	30	31	14	14	16
Cu	14	22	18	28	13	15	12
Zn	19	20	24	17	18	20	17
As	20	20	26	21	20	23	18
Ba	19	28	38	11	11	21	13
Pb	3	35	41	41	20	21	19
U	18	12	27	31	3	15	5

Para se achar a condição de compromisso para todos os elementos avaliados, calculou-se as respostas múltiplas *software* STATISTICA® versão 7.0 e estão apresentadas na Tabela 12.

Tabela 12: Dados normalizados do planejamento fatorial  $2^{3-1}$  com ponto central para estudar o efeito da concentração e volume da solução ácida e tempo de moagem sobre a porcentagem de recuperação dos elementos certificados.

Ensaio	V	Cr	Mn	Fe	Ni	Cu	Zn	As	Ba	Pb	U	Resposta Múltipla
1	0,132	0,324	0,455	0,247	0,400	0,400	0,704	0,625	0,543	0,060	0,667	4,555
2	0,526	0,824	0,758	0,247	0,657	0,629	0,741	0,625	0,800	0,700	0,444	6,951
3	1,000	1,000	1,000	0,043	0,857	0,514	0,889	0,813	1,086	0,820	1,000	9,022
4	1,000	0,235	1,121	0,204	0,886	0,800	0,630	0,656	0,314	0,820	1,148	7,815
5	0,500	0,529	0,545	0,075	0,400	0,371	0,667	0,625	0,314	0,400	0,111	4,539
6	0,447	0,529	0,515	0,075	0,400	0,429	0,741	0,719	0,600	0,420	0,556	5,431
7	0,289	0,559	0,545	0,032	0,457	0,343	0,630	0,563	0,371	0,380	0,185	4,355

Os resultados da resposta múltipla foram avaliados pelas planilhas elaboradas e disponibilizadas por Teófilo e Ferreira (2005) e os efeitos observados para as variáveis estudadas podem ser visualizados na Tabela 13.

Tabela 13: Efeitos obtidos para as variáveis avaliadas no planejamento  $2^{3-1}$  com ponto central, utilizado na otimização do procedimento de preparo da amostra de fígado bovino.

	<b>Efeitos</b>	<b>Erro</b>	<b>t (2)</b>	<b>p</b>	<b>Confundidos</b>	
SG	Média	4,78 ± 0,332	14,37	0,005	1	23
SG	C1	-2,67 ± 0,576	4,632	0,044	2	13
	C2	-0,59 ± 0,576	1,033	0,41	3	12
	C3	-1,8 ± 0,576	3,13	0,089		
SG	C123	4,62 ± 0,879	5,257	0,034		

Nível de significância  $\alpha$ : 0,050

Dentre as variáveis estudadas a concentração de ácido (C1) apresentou efeito significativo ao nível de 95%, sendo que maiores concentrações de ácido nítrico resultaram em menor erro relativo (efeito negativo). A interação entre a concentração e volume do ácido e o tempo no ultraturrax, também foi significativo. Apesar de não serem significativos, o efeito individual do volume de ácido e do tempo foram negativos, indicando que maior volume e maior tempo, melhoram as recuperações. Ao se avaliar a tabela 11, verifica-se que essa condição de todas as variáveis no nível máximo (Experimento 1) tem a resposta múltipla muito próximo do que foi obtido no ponto central (Experimentos 5 a 7). Assim, devido ao menor consumo de ácido e menor tempo de preparo da amostra, optou-se pela condição estabelecida no ponto central. Na Tabela 14 estão dispostas a melhor condição escolhida para o preparo da amostra de fígado bovino *in natura* após o estudo.

Tabela 14: Condição otimizada para o preparo da amostra de fígado bovino *in natura*.

<b>Parâmetros</b>	<b>Condições</b>
Massa da amostra	2g
Massa de HNO <sub>3</sub>	6g
Concentração de HNO <sub>3</sub>	10% v v <sup>-1</sup>
Tempo de moagem	12 minutos
Temperatura da estufa	60 °C
Temperatura secagem	30 minutos
Leitura	Imediata

## 5.2.2 Determinação do teor de cinzas e umidade

O teor de cinzas é determinado pela perda de massa em condições na qual a matéria orgânica, água e substâncias voláteis são removidas em forno mufla por incineração. O valor encontrado para o teor de umidade foi de 48% e o de cinzas ou resíduo seco foi de 97,8%.

## 5.2.3 Etapas da validação do método analítico

Para a validação, seguiu-se as diretrizes do Manual de Garantia da Qualidade Analítica do MAPA, versão 2011. Para a técnica de TXRF, como não se trabalha com curvas de calibração, não foi feito o parâmetro de linearidade e efeito de matriz. Os cálculos foram realizados com o *Microsoft Excel*. A validação foi realizada com amostras brancas e fortificadas e com o material de referência certificado da NIST 1577c.

### 5.2.3.1 Limites de detecção e de quantificação

Considerando o limite de detecção (LD) como a menor quantidade de um elemento que pode ser estatisticamente distinguido da radiação de fundo, na determinação de TXRF, os elementos são identificados e quantificados por meio de seus picos de fluorescência, portanto o LD é baseado no controle estatístico da área do pico e da radiação de fundo abaixo desse pico.

Essa radiação de fundo aparece como uma linha aproximadamente contínua abaixo dos picos e é o resultado das interações entre a radiação espalhada pela amostra e o detector, bem como a radiação emitida pela matriz da amostra.

A Figura 16 mostra um fragmento do espectro de raios-X para o fígado bovino, indicando o sinal de radiação de fundo para os elementos. Assim, um elemento é considerado detectável se a área do pico for maior três vezes que a área da radiação de fundo e quantificado quando a intensidade do pico for superior a 10 vezes.

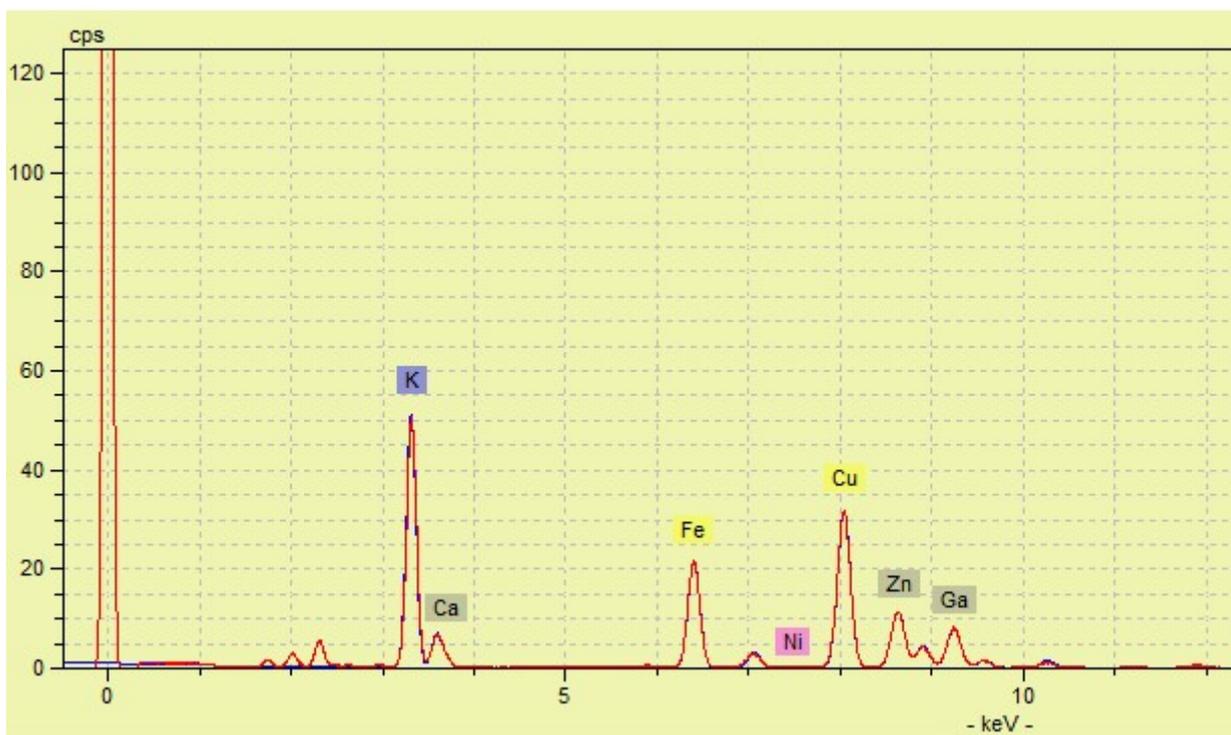


Figura 16: Parte do espectro da amostra de fígado bovino analisada no TXRF.

Fonte: O próprio autor.

O tratamento de dados e o espectro foi obtido por meio do software, sendo os elementos avaliados Al, As, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, U, Zn, Hg, Se, Sr, Co, Nb, Th, Rb, Ti, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Yb e Lu. Sendo que, como descrito no item 4.3.9.1 para os limites de detecção e quantificação foram realizadas medidas por meio da solução padrão multielementar com concentração de  $37,5 \mu\text{g L}^{-1}$ . O LD instrumental foi fornecido pelo software do equipamento, com base na relação sinal/ruído. A estimativa do LQ foi calculada multiplicando-se os valores de LD pelo fator 3,3 e a % de recuperação como disposto na Equação 1, os resultados estão descritos Tabela 15.

Tabela 15: Valores de estimativa de LD, LQ e recuperação para o padrão aquoso multielementar.

Elemento	LD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Recuperação (%)
As	0,33	1,1	102
Ba	2,2	7,3	120
Cd	9,3	31	53
Ce	1,5	4,9	80

<b>Elemento</b>	<b>LD (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b>LQ (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b>Recuperação (%)</b>
Co	2,1	6,9	117
Cu	0,37	1,2	97
Cr	0,6	2	90
Dy	0,5	1,7	92
Eu	1,9	6,3	84
Fe	1,1	3,6	98
Gd	1,3	4,3	82
Hg	0,69	2,3	26
Ho	0,76	2,5	92
La	2,8	9,2	107
Lu	3,1	10	121
Mn	0,53	1,7	97
Nd	2,4	7,9	123
Ni	0,34	1,1	101
Pb	0,26	0,86	94
Pr	3,5	11	83
Rb	0,44	1,4	105
Se	0,31	1	112
Sm	1,8	5,9	82
Sr	0,36	1,2	100
Tb	0,56	1,8	26
Th	0,21	0,69	76
Ti	2,8	9,2	101
Tm	0,41	1,4	94
U	0,28	0,92	81
V	0,86	2,8	87
Yb	0,43	1,4	93
Zn	0,4	1,3	90

ND = Não detectado

Verifica-se que todos os valores de LQ instrumentais ficaram abaixo da concentração de fortificação, com exceção de Al e o Nb. Na atmosfera do instrumento, os elementos de baixo

número atômico ( $Z < 13$ ) não podem ser detectados em baixas concentrações, pois sua radiação de fluorescência de raios-X característica é absorvida no ar, sendo essa a explicação para a não detecção do sinal para o alumínio, mesmo estando presente na solução fortificada. O Nb que está muito próximo ao pico do Mo, referente ao tubo, e não pode ser identificado em equipamentos com essa fonte de raios-X.

Para o cádmio, mesmo a amostra sendo enriquecida com solução padrão de alguns elementos, já era esperado que o Cd não apresentasse recuperação adequada, pois a produção da linha Cd  $L\alpha$  com ânodo de Mo (17,5 keV) tem uma eficiência de excitação muito baixa. Esse efeito é confirmando nos relatos de publicações anteriores para o tubo de Mo, no TXRF. Diante disso, este método não foi apropriado para determinar cádmio. Para isto, outros desenvolvimentos em tecnologia de tubo já existem como o tubo de W. A baixa recuperação para o mercúrio pode estar relacionada a volatilização durante o processo de preparo de amostra.

A deconvolução é um ajuste para melhoria da qualidade dos parâmetros analíticos. O software direciona a padronização da soma quadrada das diferenças entre o medido e o calculado, e as novas intensidades são calculadas. O valor para a qualidade de ajuste deve ser preferencialmente menor que 10. Valores mais altos ( $\chi > 10$ ) são uma indicação de identificação incorreta ou elementos não identificados respectivamente para um valor impreciso na correção de ganho. Este valor é fornecido pelo software após a leitura da amostra.

### **5.2.3.2 Limite de detecção e quantificação para o fígado bovino**

Para o cálculo do limite de detecção e quantificação do método, o fator de diluição utilizado no preparo da amostra foi considerado. O valor do LD para a matriz foi a leitura instrumental direta fornecida pelo software, sendo considerada a média das sete medidas instrumentais na matriz submetida ao procedimento de preparo. Para o LQ na matriz, considerou-se a menor concentração que pode ser quantificada, assim foi considerado para a matriz um multiplicador de 10 sobre a média das sete medidas instrumentais na matriz. Na Tabela 16 estão os valores de LD e LQ instrumentais ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e LD e LQ do método ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) para fígado bovino.

Tabela 16: Estimativa para LD e LQ para o fígado bovino.

<b>Analito</b>	<b>LDI (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b>LQI (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b>LDM (<math>\text{mg Kg}^{-1}</math>)</b>	<b>LQM (<math>\text{mg kg}^{-1}</math>)</b>
Ti	30	99	1,2	3,96
V	5,0	17	0,2	0,66
Cr	4,0	13	0,16	0,53
Mn	3,0	9,9	0,12	0,4
Fe	2,0	6,6	0,086	0,28
Co	2,0	6,6	0,087	0,29
Ni	2,0	6,6	0,083	0,27
Cu	2,0	6,6	0,081	0,27
Zn	1,5	4,9	0,063	0,21
As	0,86	2,8	0,031	0,11
Se	0,82	2,7	0,032	0,11
Rb	1,0	3,3	0,041	0,14
Sr	1,3	4,3	0,052	0,17
La	10	33	0,41	1,3
Ce	8,0	26	0,32	1,1
Pr	7,0	23	0,28	0,92
Nd	6,0	20	0,24	0,79
Sm	4,0	13	0,16	0,53
Eu	4,0	13	0,16	0,53
Gd	3,0	9,9	0,11	0,36
Tb	3,0	9,9	0,11	0,36
Ho	3,0	9,9	0,13	0,43
Tm	2,0	6,6	0,083	0,27
Lu	2,0	6,6	0,086	0,28
Hg	1,0	3,3	0,044	0,15
Pb	1,1	3,7	0,041	0,14
Th	1,3	4,3	0,053	0,17
U	2,0	6,6	0,082	0,27

Para os elementos As e Pb que tem Limites Máximos Toleráveis (LTM) estabelecidos pela ANVISA (2021), verifica-se que o LQ do método está abaixo dos LMT que são de  $1 \text{ mg kg}^{-1}$  e  $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$  para As e Pb, respectivamente, demonstrando a aplicabilidade para avaliação da conformidade de fígado bovino para consumo humano.

Verifica-se que para os demais elementos, quando maior o número atômico, menores os valores de LD e LQ obtidos, o que é uma característica das técnicas de fluorescência de raios-X.

### 5.2.3.3 Repetitividade, Precisão intermediária e exatidão

A repetitividade foi avaliada a partir dos valores de HORRAT, com base em desvios padrão relativo experimental e teórico em cada nível concentração. Calculou-se o desvio-padrão relativo teórico para cada nível de concentração utilizando a Equação de *Horwitz* (Equação 5):

$$DPRr(\%) = 2^{(1-0,5\log C)} \quad (5)$$

Equação de *Horwitz* (Miller, 2005)

C = Concentração do analito na amostra ou padrão

DPRr = Desvio padrão das repetições

O valor de HORRAT foi calculado utilizando a Equação 6, em que DPR é o desvio padrão relativo obtido a partir dos dados experimentais e PDPR<sub>R</sub> é o desvio padrão relativo predito, o cálculo foi feito utilizando as concentrações dos analitos de interesse.

$$HORRAT = \frac{DPR}{PDPR_R} \quad (6)$$

Onde:

PDPRR= Desvio-padrão relativo predito = 2C-0,15

C = Concentração ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )  $\times 10^{-9}$

DPR = Desvio padrão relativo das repetições

Para que um método seja repetitivo, o valor de DPR deve ser menor que 2/3 do  $DPR_{Horwitz}$  e o de HORRAT deve ser inferior a 1 (MAPA, 2015).

Os valores dos desvios padrão relativos para os dois níveis estão de acordo com o critério de aceitabilidade definido pelo MAPA, que estabelece um desvio padrão relativo, ou coeficiente de variação de até 20% para os níveis de concentrações estudados, os resultados obtidos por meio da Equação 7.

$$\% CV = \frac{(DP \times 100)}{CMD} \quad (7)$$

Onde:

DP = Desvio padrão

CMD = Concentração média determinada.

Todos os parâmetros para avaliação da repetitividade e precisão intermediária estão apresentados na Tabela 17.

O valor de HORRAT foi menor que 1 para a maioria dos analitos, sendo exceções os elementos Fe e Eu (nos dois níveis avaliados) e para Ti e Lu (em um dos níveis avaliados). Estes elementos também apresentaram coeficientes de variação maiores que o critério de aceitação estabelecido pelo MAPA, 20%, indicando que a precisão não foi adequada para esses elementos. No caso do Fe, a maior variação observada pode ser devida à alta concentração deste elemento na matriz sem fortificação e maior distribuição natural deste elemento no ambiente do laboratório, o que pode ter contribuído para contaminação, mesmo com todos os cuidados adotados durante as análises. Para Ti, Lu e Eu, a precisão inadequada pode ser devida à interferência das linhas de Ca para Ti, Fe para Eu e Cu para Lu. Uma vez que o equipamento utilizado possui apenas uma fonte de raios-X, não foi possível corrigir completamente essas sobreposições espectrais. Para os outros elementos avaliados, a repetitividade e a precisão intermediária foram adequadas.

Os experimentos utilizados para avaliação da precisão também foram utilizados para se avaliar a exatidão, em termos de adição e recuperação (Tabela 17). Neste sentido, o MAPA recomenda % de recuperação variando de 80 a 120%. (MAPA, 2011)

Os resultados obtidos para a recuperação ficaram dentro da faixa aceitável para esse parâmetro, é de 80% a 120%, para a maior parte dos analitos. Os elementos Fe, Th, Lu, Eu, Ho e Hg apresentaram recuperações abaixo ou acima dos critérios exigidos para exatidão, muito provavelmente por problemas de sobreposição espectral, que não puderam ser resolvidas pela deconvolução realizada pelo software. Os elementos Dy, Er, Yb merecem outros estudos, pois não apresentaram sinal na matriz bovina. Os fatos citados poderiam ser contornados pelo uso de outra fonte de raios-X, que permitisse utilizar outra transição para a quantificação.

Tabela 17: Teste de HORRAT para Repetitividade (Repe) e Precisão Intermediária (PI)

	Concentração (µg/L)	Recuperação média (%)	Desvio padrão	CV(%)Repe (n=7)	CV(%) PI n=(14)	DPR Horwitz	2/3 DPR Horwitz	HORRAT
As	50	110	11,9	10,8	6,6	25,12	16,74	0,43
	200	93	6,0	6,4	4,1	20,39	13,59	0,31
Pb	50	88	4,9	5,5	5,5	25,12	16,74	0,22
	200	103	3,0	2,9	3,0	20,39	13,59	0,14
Cu	50	104	15,3	14,7	18,2	25,12	16,74	0,59
	200	112	4,0	3,6	4,4	20,39	13,59	0,18
Mn	50	99	3,7	3,7	6,9	25,12	16,74	0,15
	200	85	2,6	3,0	3,7	20,39	13,59	0,15
Ni	50	110	7,1	6,4	7,0	25,12	16,74	0,26
	200	104	2,3	2,2	3,5	20,39	13,59	0,11
Co	50	95	3,7	3,9	4,2	25,12	16,74	0,15
	200	97	3,5	3,6	4,2	20,39	13,59	0,18
Cr	50	85	4,5	5,3	6,4	25,12	16,74	0,21
	200	76	2,9	3,8	4,4	20,39	13,59	0,19
V	50	107	5,8	5,4	5,3	25,12	16,74	0,22
	200	94	7,0	7,4	5,0	20,39	13,59	0,36
Zn	50	102	9,3	9,1	11,3	25,12	16,74	0,36
	200	109	9,7	8,9	10,2	20,39	13,59	0,44
La	50	99	9,8	9,9	10,6	25,12	16,74	0,39
	200	99	3,1	3,1	5,1	20,39	13,59	0,15
Rb	50	102	9,3	9,1	11,3	25,12	16,74	0,36
	200	109	9,7	8,9	10,2	20,39	13,59	0,44
Se	50	118	1,5	1,2	3,9	25,12	16,74	0,27
	200	111	5,6	5,1	7,6	20,39	13,59	0,25
Fe	50	230	127,0	55,2	49,2	25,12	16,74	2,20
	200	189	44,2	23,4	34,2	20,39	13,59	1,15
Ce	50	110	20,5	18,7	16,9	25,12	16,74	0,74
	200	96	1,7	1,7	4,1	20,39	13,59	0,08
Th	50	15	3,0	20,6	19,2	25,12	16,74	0,82
	200	36	0,3	0,9	10,3	20,39	13,59	0,05
Ti	50	99	13,6	13,8	13,6	25,12	16,74	0,55
	200	61	18,4	30,4	30,0	20,39	13,59	1,49
Tm	50	86	2,2	2,6	4,3	25,12	16,74	0,10
	200	72	4,9	6,9	5,8	20,39	13,59	0,34
U	50	117	6,0	5,1	6,4	25,12	16,74	0,21
	200	91	9,4	10,4	9,3	20,39	13,59	0,51
Hg	50	62	9,2	15,0	12,8	25,12	16,74	0,60
	200	70	11,1	15,9	16,1	20,39	13,59	0,78
Eu	50	65	42,9	65,7	50,1	25,12	16,74	2,62
	200	54	38,5	70,7	41,3	20,39	13,59	3,47
Ho	50	20	4,8	24,3	19,5	25,12	16,74	0,97
	200	18	4,2	22,7	22,7	22,63	13,59	1,00
Lu	50	18	4,6	25,0	39,7	25,12	16,74	0,99
	200	26	6,9	26,1	46,1	20,39	13,59	1,28
Sr	50	81	4,8	5,9	5,1	25,12	16,74	0,23
	200	94	3,6	3,8	4,6	20,39	13,59	0,19

#### 5.2.3.4 Exatidão por meio de material de referência certificado

A exatidão foi determinada também em termos da recuperação do analito presente no material de referência certificado avaliado (NIST 1577c), de acordo com a Equação 8.

$$\text{Recuperação \%} = \frac{\text{Valor certificado}}{\text{Valor encontrado}} \times 100 \quad (8)$$

A Tabela 18 apresenta os resultados da concentração dos analitos comparados com os valores certificados e seus respectivos desvios.

Tabela 18: Composição química (média  $\pm$  incerteza de medição associada) do MRC15775c com sua taxa de recuperação.

<b>Elemento</b>	<b>Valor Certificado <math>x \pm s</math> (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Valor determinado <math>x \pm s</math> (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Recuperação (%)</b>
Cu	275,2 $\pm$ 4,6	289 $\pm$ 5	105
Fe	197,94 $\pm$ 0,65	200 $\pm$ 1	101
Se	2,031 $\pm$ 0,045	2,02 $\pm$ 0,069	99
Zn	181,1 $\pm$ 1,0	186 $\pm$ 1	103
Rb	35,3 $\pm$ 1,1	35 $\pm$ 2	90
Mn	10,46 $\pm$ 0,47	10 $\pm$ 1	93
Ca	131 $\pm$ 10	159 $\pm$ 18	121
As	*19,6 $\pm$ 1,4	*15 $\pm$ 2	75
Cr	*53 $\pm$ 14	*36 $\pm$ 15	68
Pb	*62,8 $\pm$ 1,0	*58 $\pm$ 2	92
Sr	*95,3 $\pm$ 4,2	*78 $\pm$ 6	82
V	*8,17 $\pm$ 0,66	*5 $\pm$ 1	65
Hg	*5,36 $\pm$ 0,17	*3,7 $\pm$ 0,4	69

\*Teor em  $\mu\text{g kg}^{-1}$

Determinação em triplicata: média  $\pm$  incerteza de medição associada

O desvio padrão foi calculado por meio Equação 9, sendo o somatório da diferença de suas variáveis pela média aritmética ao quadrado, dividida pelo número de variáveis.



geral, o método proposto é robusto. Vale salientar que, com exceção do Ce, esses elementos já haviam apresentado performance inferior em amostras fortificadas, por problemas de contaminação e sobreposição espectral, já discutidos.

Tabela 19: Resultados dos testes de robustez para o método de análise de fígado bovino por TXRF.

<b>Analito</b>	<b>DP P.I.</b>	<b>DP Robustez</b>	<b>Fator influenciado</b>	<b>Conclusão</b>
As	6,6	9,9	Nenhum dos fatores	Os fatores em conjunto não influenciam no resultado
Pb	5,5	10	Nenhum dos fatores	Os fatores em conjunto não influenciam no resultado
Cu	18	27	Nenhum dos fatores	Os fatores em conjunto não influenciam no resultado
Mn	6,9	13	Nenhum dos fatores	Os fatores em conjunto não influenciam no resultado
Ni	7,0	13	Nenhum dos fatores	Os fatores em conjunto não influenciam no resultado
Co	4,2	12	Nenhum dos fatores	Os fatores em conjunto não influenciam no resultado
Cr	6,4	9,6	Nenhum dos fatores	Os fatores em conjunto não influenciam no resultado
V	5,3	9,0	Nenhum dos fatores	Os fatores em conjunto não influenciam no resultado
Zn	11	16	Nenhum dos fatores	Os fatores em conjunto não influenciam no resultado
La	11	13	Nenhum dos fatores	Os fatores em conjunto não influenciam no resultado
Rb	11	21	Nenhum dos fatores	Os fatores em conjunto não influenciam no resultado
Se	3,9	7,5	Nenhum dos fatores	Os fatores em conjunto não influenciam no resultado
*Fe	49	172	Massa da amostra, tempo de moagem, concentração do ácido	Significativo

<b>Analito</b>	<b>DP P.I.</b>	<b>DP Robustez</b>	<b>Fator influenciado</b>	<b>Conclusão</b>
*Ce	17	54	Massa da amostra e tempo de moagem	Significativo
Th	19	32	Nenhum dos fatores	Os fatores em conjunto não influenciam no resultado
*Ti	14	49	Massa da amostra, tempo de moagem, concentração do ácido	Significativo
Tm	4,3	5,8	Nenhum dos fatores	Os fatores em conjunto não influenciam no resultado
U	6,4	10	Nenhum dos fatores	Os fatores em conjunto não influenciam no resultado
*Hg	13	40	Temperatura da estufa e tempo de secagem	Significativo
*Eu	50	160	Massa da amostra e tempo de moagem	Significativo
Ho	19	21	Nenhum dos fatores	Os fatores em conjunto não influenciam no resultado
*Lu	40	43	Massa da amostra e tempo de moagem	Significativo
Sr	5,1	5,6	Nenhum dos fatores	Os fatores em conjunto não influenciam no resultado

\*DP P.I.= Desvio padrão precisão intermediária      DP Robustez= Desvio padrão da robustez  
\*Elementos que foram influenciados pelas pequenas variações.

#### **5.2.4 Quantificação das amostras comerciais**

Para servir de referência quanto aos teores dos metais de fígado bovino *in natura* no Brasil é disponibilizado para a população a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO, em sua 4ª edição revisada e ampliada. A tabela contempla os minerais cálcio, ferro, magnésio, manganês, fósforo, sódio, potássio, cobre e zinco. Esses analitos foram determinados por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado – ICP OES, segundo AOAC. O preparo das amostras e as análises foram executadas nos laboratórios do

Departamento de Nutrição – Faculdade de Saúde Pública, da USP e por laboratórios selecionados pelo seu desempenho satisfatório nos Estudos Interlaboratoriais Cooperativos. Os valores determinados na TACO para fígado bovino cru, estão na Tabela 20, sendo que as amostras de carne bovina foram adquiridas junto a um frigorífico localizado na cidade de Lins-SP, que recebe gado de corte das maiores regiões criadoras do Brasil: Sudeste, Sul e Centro-Oeste.

Tabela 20: Composição de fígado bovino *in natura* dos minerais de acordo com a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO, em sua 4ª edição revisada e ampliada.

<b>Elementos</b>	Ca	Mg	Mn	P	Fe	Na	K	Cu	Zn
<b>Valor determinado/ mg kg<sup>-1</sup></b>	40	20	2,6	3340	56	760	2650	90,1	35

Fonte: Adaptada da Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO, em sua 4ª edição revisada e ampliada.

Na Tabela 21, estão apresentadas as concentrações calculadas do analitos das amostras coletadas no interior de Minas Gerais e na capital, como descrito no item 4.3.1. Os ensaios foram realizados em triplicata seguindo a metodologia proposta nesse trabalho e o desvio padrão calculado conforme Equação 9.

Tabela 21: Resultados dos teores dos metais e metaloides no fígado bovino *in natura* em Minas Gerais pela técnica TXRF.

<b>Elemento</b>	<b>Belo Horizonte mg kg<sup>-1</sup></b>	<b>Barbacena mg kg<sup>-1</sup></b>	<b>Rio Pomba mg kg<sup>-1</sup></b>	<b>Cataguases mg kg<sup>-1</sup></b>	<b>Contagem mg kg<sup>-1</sup></b>
K	2146 ± 18	2078 ± 13	2369 ± 12	2016 ± 18	1938 ± 17
Mn	3,5 ± 0,2	3,0 ± 0,1	3,4 ± 0,1	2,9 ± 0,1	3,9 ± 0,5
Fe	128 ± 4	50 ± 1	142 ± 2	48 ± 4	122 ± 7
Co	0,55 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,19 ± 0,01
Cu	32 ± 1	77 ± 1	32 ± 1	78 ± 2	43 ± 3
As	0,025 ± 0,002	0,04 ± 0,01	0,033 ± ,005	0,072 ± 0,003	0,05 ± 0,01
Zn	42 ± 2	34 ± 3	41 ± 2	33 ± 2	45 ± 4
Se	0,4 ± 0,1	0,19 ± 0,01	0,29 ± 0,02	0,31 ± 0,05	0,54 ± 0,09
Pb	0,05 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,07 ± 0,01
Rb	84 ± 4	39 ± 5	83 ± 3	31 ± 3	91 ± 5
La	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,05 ± ,001	0,11 ± 0,02	0,07 ± 0,01
Ca	60 ± 2	59 ± 3	55 ± 2	49 ± 4	68 ± 2
P	2190 ± 111	1623 ± 92	1820 ± 124	2090 ± 155	2799 ± 231

Determinação em triplicata: média ± desvio padrão

\*Os valores na tabela 21 dos elementos As ao P estão em  $\mu\text{g L}^{-1}$

Observando os resultados obtidos com os da Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO da Tabela 20, os valores de concentrações para alguns elementos, estão no mesmo nível como no caso do Ca, Zn, K, P e Mn, demonstrando a aplicabilidade do método. Observa-se também a variabilidade das concentrações principalmente para Fe e Cu nos fígados coletados em Minas, podendo ter relações com a constituição do solo local, alimentação do animal ou outros fatores ambientais. Os elementos controlados pela fiscalização As e Pb, em nenhuma amostra ultrapassou os LMT, isso demonstra que o fígado bovino dessas regiões está em conformidade com a legislação brasileira.

A Figura 18 está ilustrando o espectro do fígado bovino de uma das replicatas analisadas no TXRF referente à cidade de Belo Horizonte. Na abcissa tem-se a energia característica do elemento e na ordenada o número de contagens por segundo, desta relação a concentração do elemento é calculada considerando o fator de diluição relativo a todas as etapas do preparo da amostra até a técnica instrumental.

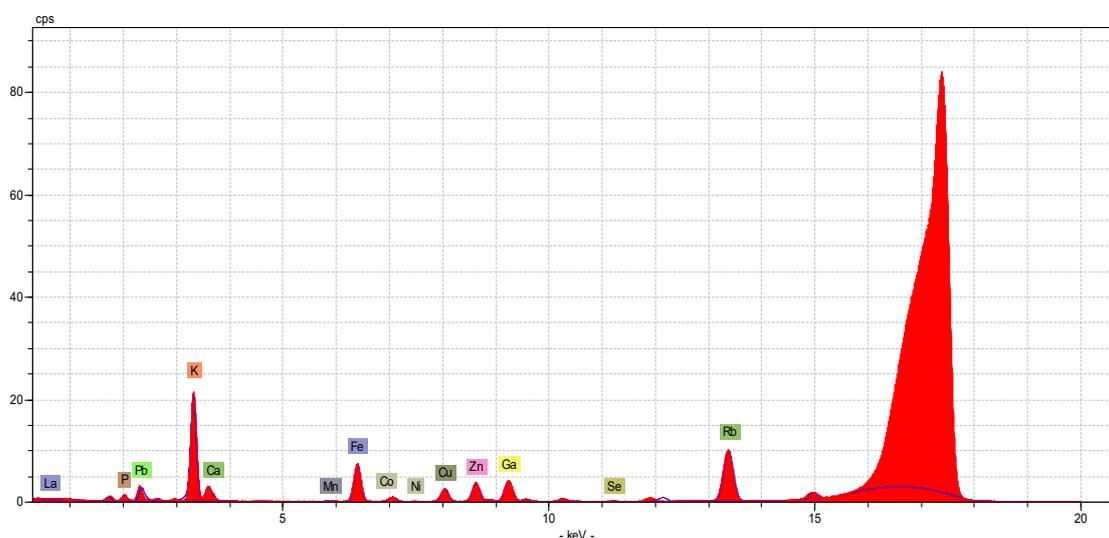


Figura 18: Espectro do fígado bovino da cidade de Belo Horizonte obtido no TXRF

Fonte: O próprio autor

O Guia de referência *Veterinary Laboratory Association Quality Assurance Program*, do Canadá, estabelece limites de toxicidade para o fígado bovino fresco, como demonstrado na Tabela 22 para os elementos Se, Cu e Zn Tabela 22

Tabela 22: Valores referencias dos teores de Se, Cu, Zn em fígado bovino *in natura* em mg kg<sup>-1</sup>.

<b>Elemento</b>	<b>Toxicidade</b>	<b>Fígado</b>
Selênio	Margem deficiente	0,02-0,25
	Deficiente	ND
	Margem deficiente	ND
	Adequado	0,25-0,50
	Alto	0,75-1,25
	Tóxico - Crônico	1,25-7,00
Cobre	Agudo	7,00-47,0
	Deficiente	0,5-10,0
	Margem deficiente	5,0-25,0
	Adequado	25,0-100
	Alto	200-550
Zinco	Tóxico	250-800
	Deficiente	<20-40
	Margem	25-40
	Adequado	25-100
	Alto	300-500
	Tóxico	120-500

\* ND= não determinado

Fonte: Adaptada de AVC/UPEI - Canadá, 2020.

Essa dissertação não teve o propósito de avaliar os motivos relacionados com as diferenças nas concentrações dos metais e metaloides dessas matrizes, devido a influência da localização, para isto, outros estudos de monitoramento ambiental específicos devem ser realizados.

### 5.2.5 Comparação com outras técnicas analíticas

Também nesse trabalho, uma amostra de fígado bovino *in natura* foi analisada por TXRF e por ICP-MS/MS, para comparação dos resultados. A amostra de fígado *in natura* da rede comercial foi encaminhada para quantificação em um laboratório confiável que utiliza a técnica ICP-MS/MS, sendo um Espectrômetro de Massas Triplo Quadrupolo Acoplado a Plasma Induzido (ICP-MS/MS), Agilent. O preparo da amostra foi na condição *in natura* utilizando como procedimento a digestão assistida por radiação micro-ondas. Os resultados dos analitos estão apresentados nas Tabela 23 e Tabela 24.

Tabela 23: Valores dos analitos em teores maiores utilizando as técnicas de TXRF e ICP-MS-MS.

<b>Analito</b>	<b>TXRF (mg Kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>ICP-MS (mg Kg<sup>-1</sup>)</b>
Fe	183 ± 6	157 ± 3
Mn	2,9 ± 0,3	3,23 ± 0,06
Cu	77 ± 3	62,1 ± 1,8
Zn	41 ± 5	77 ± 2

Tabela 24: Valores dos analitos em teores menores utilizando as técnicas de TXRF e ICP-MS.

<b>Analito</b>	<b>TXRF (µg kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>ICP-MS (µg kg<sup>-1</sup>)</b>
As	43±3	<45
Cd	*NC	58±1
Cr	29±4	<45
Ni	36±4	<45
Pb	43±4	52±3
Co	155±5	151±4
V	65±8	57±4
La	59±7	67±1
Ce	123±9	105±3

\* NC=Não Caracterizado

Os resultados apresentaram boa concordância evidenciando que o método desenvolvido é adequado para análise de amostras de fígado bovino.

## 6. CONCLUSÃO

O método desenvolvido é simples e rápido, se comparado aos procedimentos que envolvem digestão assistida por radiação micro-ondas e obteve desempenho satisfatório para a determinação dos elementos As, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, Zn, Se, Sr, Co, V, Rb, Ti, La, U, Ce e Tm, em fígado bovino *in natura* por TXRF. Nos estudos de adição e recuperação, o analito ferro na amostra fresca, apresentou recuperações acima de 120%, assim como incoerências na precisão, entretanto, no material de referência certificado, resultados adequados foram obtidos, demonstrando a aplicabilidade também para esses elementos. Os parâmetros de validação que foram avaliados estão de acordo com os critérios estabelecidos pelo MAPA. Vale ressaltar que a linearidade e seletividade não fazem parte desse estudo. A linearidade não foi estudada, pois a técnica de TXRF não requer o preparo de curva de calibração e é isenta de efeitos de matriz. Da mesma forma, a seletividade é justificada pela potencialidade da técnica do TXRF ser capaz de detectar e quantificar as concentrações químicas dos elementos presentes na amostra analisada, devido a radiação de fluorescência emitida proveniente de cada átomo é característica da espécie química, ou seja, não existe similaridade entre as radiações de radiofrequência emitidas por diferentes átomos da Tabela Periódica.

Os estudos conduzidos por meio da análise da suspensão ácida de fígado bovino por TXRF mostraram resultados satisfatórios, resguardada a limitação da técnica em determinar Cd em presença de K. Isso é característico em amostras com alta quantidade de potássio, como observado nesse trabalho para o fígado bovino, além de outros trabalhos publicados utilizando a técnica de TXRF. A produção da linha Cd  $L\alpha$  com ânodo de Mo (17,5 keV) tem uma eficiência de excitação muito baixa, outros tipos de tubo como o de W, pode ser uma opção para esse analito no TXRF. Diante disso, este método não é apropriado para determinar Cd. O analito Nb sofre interferências, devido proximidade com o tubo de Mo, não sendo possível determiná-lo.

Elementos de número atômico baixo como Al, F, C, Na e Mg necessitam de uma excitação de energia diferenciada, para isto, espectrômetros com fonte de excitação de baixa energia estão sendo desenvolvidos com sucesso pelos fabricantes de espectrômetros de fluorescência, como por exemplo, a radiação Cr ka. (HOEFLER et al., 2006)

Os resultados obtidos para a análise do fígado *in natura* demonstraram desempenho do método desenvolvido, visto que a matriz é complexa, devido ao alto teor de gordura. Vale ressaltar, que o desenvolvimento do preparo da amostra que levou a suspensão, foi predominante para esse efeito.

Os resultados das análises quantitativas indicaram que os teores dos metais e metaloides estavam em concordância com os padrões apresentados para fígado seco indicando assim, que o processo de se trabalhar diretamente com a amostra *in natura* não alterou a concordância com os resultados. Sendo assim, uma alternativa com grande potencial para utilização nos laboratórios de pesquisa. Também, os avanços tecnológicos da espectrometria de fluorescência de raios-X cada vez mais demonstra ser uma técnica não apenas inovadora, mas também muito poderosa para se realizar pesquisas de caracterização de materiais em diversas áreas em ampla faixa de concentração. Em especial no TXRF, as determinações quantitativas utilizando a técnica vão desde a simples utilização de curvas intensidade por concentração padrão até sofisticados programas que convertem intensidade para concentração.

Importante ressaltar que a técnica TXRF juntamente com o desenvolvimento de um preparo de amostra particularmente eficaz é uma alternativa potente e eficaz para realizar análises elementares em áreas de pesquisas científicas.

Finalmente, essa dissertação, além de todos os objetivos acadêmicos estabelecidos e necessários para o desenvolvimento acadêmico, teve também o propósito de contribuir de alguma forma para segurança alimentar e saúde da população.

## 7. TRABALHOS FUTUROS

- Desenvolver trabalhos utilizando a técnica de TXRF com um sistema de purga de hélio, já que este possui a capacidade de melhorar a sensibilidade para elementos leves, como exemplo, o Al.
- Outra sugestão, seria a utilização de fontes de radiação de W, como alternativa para melhorar a detecção de linha K, de elementos com altos números atômico como Cd.
- Uma inovação é a determinação dos elementos de baixos número atômico, como Al, C, F, Na, Mg, para isso alguns espectrômetros estão sendo desenvolvidos com sucesso equipado com a câmara de vácuo e fonte de excitação de baixa energia, como a radiação Cr K $\alpha$  (HOEFLER et al.; 2006) e (STRELI et al.; 1997) e (TARSOLY et al.; 2010). Outros desenvolvimentos em preparo de amostras para serem aplicados no TXRF em matrizes diversas.
- A técnica TXRF não requer a elaboração de uma curva de calibração, porém, essa possibilidade pode ser avaliada com mais detalhes através da curva de calibração para elementos específicos de interesse.
- Ainda existe uma lacuna no desenvolvimento de abordagens para implementar validações em análises qualitativas, que é um importante ramo de pesquisa. Nesse sentido, a técnica TXRF, por possuir um sistema de analisadores computacionais multicanal, além da distribuição espectral e de energia, também pode obter e realizar a análise dos dados gerados durante o processo de forma rápida e eficiente, de forma eficiente, tão importante para métodos *screening* ou métodos qualitativos.

## REFERÊNCIAS

ANASTAS, P. T.; WARNER, J. C. *Green Chemistry: Theory and Practice*; Oxford University Press: Oxford, U.K., 1998.

ANVISA-Diretoria Colegiada - RDC nº 255, de 10 de dezembro de 2018, adota a Instrução Normativa, conforme deliberado em reunião realizada em 25 de março de 2021.

AOAC (AOAC Research Institute). AOAC® Performance Test Methods Program, Policies and procedures. Disponível em: <[www.aoac.org/testkits/Policies%20&%20Procedures.pdf](http://www.aoac.org/testkits/Policies%20&%20Procedures.pdf)>. Acesso em: 20/01/2022.

Apostila A contaminação dos lençóis freáticos provenientes do uso de agrotóxicos. Edilaine Bastos Silva. *EdilmereSprada*; Toxicologia.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) 1992. *Case studies in environmental medicine – lead toxicity* US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta.

BAMPIDIS, V.A.; NISTOR, E.; NITAS, D. Arsenic, Cadmium, Lead and Mercury as Undesirable Substances in Animal Feeds. *Animal Science and Biotechnologies*, v. 46(1), p. 17-22, 2013.

BARBOSA, É. S., EVANGELISTA, G. F., PIMENTA, E. M., SILVÉRIO, F. O., & PINHO, G. P. DE .. (2014). Otimização e validação da extração sólido-líquido e purificação em baixa temperatura de HPAs em lodo de esgoto. *Química Nova*, 37(3), 404–410. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140068>

BASRI; SAKAKIBARA, M.; SERA, K.; KURNIAWAN, I.A.; Mercury Contamination of Cattle in Artisanal and Small-Scale Gold Mining in Bombana, Southeast Sulawesi, Indonesia. *Geosciences*, v. 7 (133) p. 1-10, Dez. 2017.

BJRNSTAD, T.; MAGGIO, G. E.; *Radiotracer technology as applied to interwell communication in oilfields*; Manuscript, IAEA: Vienna, 2000; Rossi, P.; *Ph. D. Thesis*, University of Neuchâtel, 1994.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. PORTARIA Nº 1, DE 07 DE OUTUBRO DE 1981: Aprovar os Métodos Analíticos para Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes, constituindo-se em Métodos Microbiológicos e Métodos Físicos e Químicos. Diário Oficial da União, 1981.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Métodos Oficiais para Análise de Produtos de Origem Animal / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: MAPA, 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Valor Bruto da Produção Agropecuária (VBP): VBP - Dezembro/2020 - Regional por UF. 2020a. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/politica-agricola/valor-bruto-da-producaoagropecuaria-vbp>

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa número 8, de 29 de abril de 2010. Diário Oficial [da] União. Brasília, DF. 03 mai 2010; Seção 1, p. 27-30.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. II – Métodos físicos e químicos. Brasília (DF), 1981. cap. I, p. 2. CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGY – ICoMST, 2003. Campinas: CTC-ITAL, 2003. p. 405-406.

BREMNER I. Manifestations of copper excess. *Am J Clin Nutr.* 67:1069S–1073, 1998.

BRITO, M. C. A. *et al.* Trade and quality control of medicinal plants in Brazil. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 8, n. 10, p. 32–39, 95 2016.

BRUKER. ESPECTRÔMETROS TXRF PICOFOX, S2. 2012. Disponível em: <<https://www.bruker.com/pt/products-and-solutions/elemental-analyzers/txrf-spectrometers/s2-picofox.html>>.

BRUKER. ESPECTRÔMETROS TXRF S4 T-STAR. 2019. Disponível em: <<https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/elemental-analyzers/txrf-spectrometers/s4-t-star.html>>.

BUTTON, S. T. Metodologia para planejamento experimental e análise de resultados, 2016. Disponível em: <<http://www.fem.unicamp.br/~sergio1/pos-graduacao/IM317/apostila2012.pdf>> Acesso: 23/09/21.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. Planejamento de experimentos usando o Statistica. Editora E-papers, 2003

CAMPOS, L. O Vitaminado Fígado. 2003. Disponível em:<<https://www.beefpoint.com.br/o-vitaminado-figado49/#:~:text=O%20f%C3%ADgado%20%C3%A9%20um%20alimento,fonte%20de%20ferro%20e%20tiamina.>>. Acesso em: 26/11/2022.

CONNOR, J.R, PAVLICK, G., KARLI, D. A histochemical study of iron-positive cells in the developing rat brain. *J Comp Neurol* . 355:111–123,1995.

COSTA CLS, PRAIS CT, NASCENTES CC. A simple method for glass analysis using total reflection X-ray fluorescence spectrometry. *Talanta*. 2022 Jun 1;243:123354. doi: 10.1016/j.talanta.2022.123354. Epub 2022 Mar 2. PMID: 35325749.

D. A. SKOOG, D. M. WEST, F. J. HOLLER, S. R. CROUCH. Fundamentos de Química Analítica; 8a Ed., Cengage Learning, 2006.

DAL-PIZZOL, F., KLAMT, F., FROTA, M.L.C. Neonatal iron exposure induces oxidative stress in adult Wistar rat. *Develop Brain Res.*130:109–114, 2001

DE FRANCISCO, N., RUIZ TROYA, J.D., AGÜERA, E.I. Lead and lead toxicity in domestic and free living birds. *Avian Pathology*, 32:3-13, 2003.

DE LA CALLE, I. Sample pretreatment strategies for total reflection X-ray fluorescence analysis: A tutorial review. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, v. 90, p. 23-54, 2013. ISSN 05848547.

DE LA CALLE, I. et al. Sample pretreatment strategies for total reflection X-ray fluorescence analysis: A tutorial review. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, v. 90, p. 23-54, 2013. ISSN 05848547.

DIAS, D. L. Química Verde. Disponível em: <https://www.manualdaquimica.com/quimica-ambiental/quimica-verde.htm>. Acesso em: 16/11/2022.

DOEHLERT, D. H. Uniform shell designs. *Applied Statistics*, v. 19, n. 3, p. 231-239, 1970. <http://dx.doi.org/10.2307/2346327>

DU, Z., HEMKEN, R.W., HARMON, R.J. Copper metabolism of Holstein and Jersey cows and heifers fed diets high in cupric sulfate or copper proteinate. *J Dairy Sci.* 79:1873–1880, 1996.

EPA. Toxicological Review of Hexavalent chromium. Washington: EPA 2010.

EVERS, D. The Effects of Methylmercury on Wildlife: A Comprehensive Review and Approach for Interpretation. *Encyclopedia of the Anthropocene*, v. 5, p. 181-194, 2018.

F. J. Krug. Métodos de preparo de amostras: fundamentos sobre o preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar; 1ª ed., 2010.

FELICIANO, G. G.; PASQUALETO, O. Q. F. Meio ambiente laboral equilibrado: análise do caso Brumadinho. *Veredas do Direito*, Belo Horizonte, v. 16, n. 36, p. 191-216, set/dez. 2019. Disponível em: <http://www.domhelder.edu.br/revista/index.php/veredas/article/view/1556>. Acesso em: 13/04/2023

FREDRIKSSON, A., SCHRÖDER, N., ERIKSSON, P., ET AL. Neonatal iron exposure induces neurobehavioural dysfunction in mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 155:25–30, 1999.

G. V. PASHKOVA & A. G. REVENKO (2015) A Review of Application of Total Reflection X-ray Fluorescence Spectrometry to Water Analysis, *Applied Spectroscopy Reviews*, 50:6, 443-473, DOI: 10.1080/05704928.2015.1010205.

GARLAND, T. Arsenic, In: *Veterinary Toxicology, Basic and Clinical Principles*, Gupta, R.C. (ed). Academic Press, Nova York, 2007.

GRUBER, A., MÜLLER, R., WAGNER, A. *et al.* Total reflection X-ray fluorescence spectrometry for trace determination of iron and some additional elements in biological samples. *Anal Bioanal Chem* 412, 6419–6429 (2020). Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02614-8>

HARLIA, E.; SURYANINGSIH, L.; SURYANTO, D.; ISTIQOMAH, H.; KOMARIAH, R.W. Safety Study of Milled Beef and Slices Beef Jerky Viewed from Cadmium and Plumbum Heavy Metals Contamination. *The First International Symposium on Food and Agro-biodiversity (ISFA2014)*. *Procedia Food Science*, v.3, p. 409-412, 2015.

HEIDER, M. A evolução das terras raras. 2018. Disponível em:

<<https://www.inthemine.com.br/site/a-evolucao-das-terras-raras-no-brasil/>>

HILL, G.M. & SHANNON, M.C. Copper and Zinc Nutritional Issues for Agricultural Animal Production. *Biological Trace Element Research*, v. 188 (1), p. 148-159, Jan. 2019.

HILL, Gretchen Myers; SHANNON, Marcia Carlson. Copper and zinc nutritional issues for agricultural animal production. *Biological trace element research*, v. 188, p. 148-159, 2019.

HOEFLER, H., STRELI, C., WOBRAUSCHEK, P., OVARI, M., AND ZARAY, GY. (2006) Analysis of low Z elements in various environmental samples with total reflection X-ray fluorescence (TXRF) spectrometry. *Spectrochim. Acta B Atom. Spectros.*, 61 (10–11): 1135–1140.

HOENIG, M., Preparation steps in environmental trace element analysis - facts and traps. *Talanta*, Amsterdam, v.54, p.1021-1038, 2001.

HOOSER, S. B. Iron. In: *Veterinary Toxicology, Basic and Clinical Principles*, Gupta, R.C. (ed). Academic Press, Nova York, 2007.

How Does TXRF Work? (Ou: Como a técnica TXRF funciona?) Disponível em:

<<https://www.bruker.com/en/landingpages/bna/how-does-TXRF-work.html>> Acesso em: 03/05/2023.

INMETRO, Orientação sobre validação de métodos analíticos (2016).

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial - INMETRO. DOQ-CGCRE-008. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro: INMETRO; 2010. 35p.

Instrução Normativa SDA/MAA 42/1999 (D.O.U. 22/12/1999) MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 42, DE 20 DE DEZEMBRO DE 1999 O SECRETÁRIO DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO, Plano Nacional do Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal ; PNCR e os Programas de Controle.

International Agency for Research on Cancer. Latest global cancer data: Cancer burden rises to 19.3 million new cases and 10.0 million cancer deaths in 2020, 2020b. Disponível em: <<https://www.iarc.fr/news-events/latest-global-cancer-data-cancer-burden-rises-to-19-3-million-new-cases-and-10-0-million-cancer-deaths-in-2020/>>.

ISO/FDIS 20289:2017(E) INTERNATIONAL STANDARD I Surface chemical analysis — Total reflection X-ray fluorescence analysis of water Analysechimique des surfaces.

ISO/TS 18507:2015-Surface chemical analysis — Use of Total Reflection X-ray Fluorescence spectroscopy in biological and environmental analysis.

KINGSTON, H.M., JASSIE, L.B., editors. *Introduction to Microwave Sample Preparation – Theory and Practice*. ACS Professional Reference Book. Washington, 1988. 263p.

- KLOCKENKÄMPER, R.; VON BOHLEN, A. Elemental Analysis of Environmental Samples by Total Reflection X-Ray Fluorescence: A Review. *X-Ray Spectrometry*, v. 25, n. 4, p. 156-162, 1996. ISSN 00498246.
- KRUG, F.J.; NÓBREGA, J.A.; GUERRA, M.B.B.; ROCHA, F. R. P.; MATIAS, TELMA BLANCO. Solubilização e decomposição de sólidos Inorgânicos. Em: Francisco José Krug; Fábio Rodrigo PIOVEZANI ROCHA. (Org.). Métodos de Preparo de Amostras para Análise Elementar. 1ed.São Paulo. :Edit SBQ. 2016.p. 223-252.
- KRUG, F.J.; ROCHA, F.R.P. Métodos de Preparo de Amostras para Análise Elementar. 1 ed. São Paulo: Edit SBQ, 2016. v. 1, p. 572.
- KRUG, Francisco J. *et al.* Guia Prático de Perguntas e Respostas sobre ICP-OES, ICP-MS e Preparo de Amostras. São Paulo, 2001. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/45709/guia-pratico-de-perguntas-e-respostas-sobre-icp-oes-icp-ms-e-preparo-de-amostras>. Acesso em: 15 nov. 2022.
- KRUG, FRANCISCO JOSÉ Métodos de preparo de amostras para análise elementar / 2. ed. rev. ampl. / editado por Francisco José Krug; Fábio Rodrigo Piovezani Rocha - São Paulo: Edit SBQ – Sociedade Brasileira de Química, 2019. 586 p.: il.
- LAN, J., JIANG, D.H. Excessive iron accumulation in the brain: a possible potential risk of neurodegeneration in Parkinson's disease. *J Neural Transm.* 104:649–660, 1997.
- LI, H., CHEN, Q., LI, S., ET AL. Effect of Cr (VI) exposure on sperm quality: human and animal studies. *Ann Occup Hyg.* 45(7): 505–11, 2001.
- Manual de garantia da qualidade analítica: áreas de identidade e qualidade de alimentos e de insumos / Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: MAPA/ACS, 2015.
- MANZINI, FLÁVIO FERNANDO; SÁ, KAOARA BATISTA DE; PLICAS, LÍDIA MARIA DE ALMEIDA. Metais pesados: fonte e ação toxicológica. *Fórum Ambiental da Alta Paulista*, v. 6, n. 12, p. 800-815, 2010.
- MARGUÍ E, DE FÁTIMA MARQUES A, DE LURDES PRISAL M, HIDALGO M, QUERALT I, CARVALHO ML. Total reflection X-ray spectrometry (TXRF) for trace elements assessment in edible clams. *Appl Spectrosc.* 2014;68(11):1241-6. doi: 10.1366/13-07364. Epub 2014 Oct 1. PMID: 25286343.
- MARGUÍ E, QUERALT I, ANDREY D, PERRING L. Analytical potential of total reflection X-ray fluorescence (TXRF) instrumentation for simple determination of major and trace elements in milk powder samples. *Food Chem.* 2022 Jul 30;383:132590. doi: 10.1016/j.foodchem.2022.132590. Epub 2022 Feb 28. PMID: 35255365.
- MARGUÍ, E.; ZAWISZA, B.; SITKO, R. Trace and ultratrace analysis of liquid samples by Xray fluorescence spectrometry. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 53, p. 73-83, 2014. ISSN 01659936., 2014
- MAROUANI, N., TEBOURBI, O., MAHJOUR, S., ET AL.: Effects of hexavalent chromium on reproductive functions of male adult rats. *Reprod Biol.* 12(2): 119–33, 2012.

- MARTIN, P. Nutriçãoempauta [online]. 2006 Disponível em: <[https://www.nutricaoempauta.com.br/lista\\_artigo\\_.php?cod=528](https://www.nutricaoempauta.com.br/lista_artigo_.php?cod=528)>. Acesso em: 27/11/2022.
- MAURÍCIO, Ângelo de Queiroz *et al.* Manual de Garantia da Qualidade Analítica: resíduos e contaminantes em alimentos. Brasília: Biblioteca Nacional de Agricultura – Binagr, 2011. 227 p. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
- MAURÍCIO, ÂNGELO DE QUEIROZ. Manual de Garantia da Qualidade Analítica: resíduos e contaminantes em alimentos. Brasília: Biblioteca Nacional de Agricultura – Binagr, 2011. 227 p. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Mapa.
- MELO, EDUARDO PIMENTA DE ALMEIDA. A Importância da Validação de Métodos Analíticos. 2020. Disponível em: <<https://revistaanalytica.com.br/a-importancia-da-validacao-de-metodos-analiticos/>>. Acesso em: 18/12/2022.
- MINDELL, E.; MUNDIS, H. Vitaminas: guia prático das propriedades e aplicações. Trad. R. J. Schneider. São Paulo: Melhoramentos. Viver com saúde. 1996.
- MISRA, N. L.; SINGH MUDHER, K. D. TOTAL REFLECTION X-HAY FLUORESCENCE: A TECHNIQUE FOR TRACE ELEMENT ANALYSIS IN MATERIALS. *Progress in Crystal Growth and Characterization*, v. 8974, n. 02, p. 65–74, 2002.
- NAGATA, N.; BUENO, M. I. M. S.; PERALTA-ZAMORA, P. G. Métodos Matemáticos para Correção de Interferências Espectrais e Efeitos Inter-elementos na Análise Quantitativa por Fluorescência de Raios-X. *Química Nova*, v. 24, n. 4, p. 531-539, 2001.
- NASCIMENTO FILHO, Virgílio F.. Técnicas Analíticas Nucleares de Fluorescência de Raios-X por Dispersão de Energia (ED-XRF) e por Reflexão Total (TXRF). Campinas: Depto de Ciências Exatas/Esalq, 1999. Disponível em: <<http://www.fem.unicamp.br/~giorgia/fluorescencia.pdf>>. Acesso em: 12/08/2022.
- NASCIMENTO-DIAS BL DO, OLIVEIRA DF, ANJOS MJ DOS. A utilização e a relevância multidisciplinar da fluorescência de raios X. *Rev Bras Ensino Fís* [Internet]. 2017;39(Rev. Bras. Ensino Fís., 2017 39(4)). Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1806-9126-RBEF-2017-0089>.
- NEPA – NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO). 4ª ed. Campinas: NEPA – UNICAMP, 2011.
- NRIAGU, J.O.; PACYNA, J.M. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils with trace metals. *Nature*, v. 33, p. 134-139, 1988.
- O'NEAL, S.L. & ZHENG, W. Manganese Toxicity Upon Overexposure: a Decade in Review. *Current Environmental Health Reports*, v. 2(3), p. 315–328, Set. 2015.
- OLIVEIRA, E. “Sample Preparation for Atomic Spectroscopy: Evolution and Future Trends”; *J. Braz. Chem. Soc.* 14(2003) 174-182.
- Os 12 Princípios da Química Verde, PAUL ANASTAS E JOHN WARNER no livro: *Green Chemistry: Theory and Practice* (Oxford University Press: New York, 1998) (*Química Verde: Teoria e Prática -Nova Iorque, 1998*).

PAUSTENBACH DJ. A physiologically based model for the ingestion of chromium(III) and chromium(VI) by humans. *Toxicol Sci.* 2001 Apr;60(2):196-213. doi: 10.1093/toxsci/60.2.196. PMID: 11248132.

PEREIRA, G.C. & EBECKEN, N.F.F. (2009) Knowledge discovering for coastal waters classification. *Expert Systems with Applications*, v. 36, n. 4, p. 8604-8609.

PICCOLI, R. et al. Características das principais técnicas analíticas aplicadas à caracterização de materiais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIAS DOS MATERIAIS, 17. Paraná. 2006. Disponível em: <<http://www.metallum.com.br/17cbecimat/resumos/17cbecimat-102-028.pdf>>.

PROGRAMA INTERNACIONAL DE SEGURANÇA QUÍMICA SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS PERIGOSAS À SAÚDE E AO AMBIENTE / Organização Mundial da Saúde, Programa Internacional de Segurança Química; tradução Janaína Conrado Lyra da Fonseca, Mary Rosa Rodrigues de Marchi, Jassyara Conrado Lyra da Fonseca. -- São Paulo: Cultura Acadêmica, 2008.

R. JENKINS, R. W. GOULD AND D. GEDCKE, "Quantitative X-Ray Spectrometry," Marcel Dekker, New York, 1995.

REDAÇÃO, Da. Caso Samarco. 2015. Disponível em [https://www.mpf.mp.br/grandes-casos/caso-samarco/o-desastre#:~:text=O%20dia%20do%20desastre,Munic%C3%ADpio%20de%20Mariana%20\(MG\)](https://www.mpf.mp.br/grandes-casos/caso-samarco/o-desastre#:~:text=O%20dia%20do%20desastre,Munic%C3%ADpio%20de%20Mariana%20(MG).). Acesso em: 13 jun. 2022.

REDAÇÃO, Da. Lama das barragens já matou 11 toneladas de peixes, diz IBAMA. 2015. Disponível em: <https://veja.abril.com.br/politica/lama-das-barragens-ja-matou-11-toneladas-de-peixes-diz-ibama/>. Acesso em: 16 jun. 2022.

REGULAMENTO TÉCNICO MERCOSUL SOBRE LIMITES MÁXIMOS DE CONTAMINANTES INORGÂNICOS EM ALIMENTOS. Também a Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), no uso das atribuições que lhe confere o art. 15, III e IV, aliado ao art. 7º, III e IV da Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999, e ao art. 53, VII, §§ 1º e 3º, do Regimento Interno aprovado pela Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 255, de 10 de dezembro de 2018.

REIS, L.S.L.S.; PARDO, P.E.; CAMARGOS, A.S.; OBA, E. Mineral element and heavy metal poisoning in animals. *Journal of Medicine and Medical Sciences*, v. 1(12), p. 560-579, Dez. 2010.

RESENDE, L. V. Desenvolvimento de métodos para análise de tortas de oleaginosas por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado e fluorescência de raios X por reflexão total. Tese. Doutorado em química. Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brasil. 2015.

Review of Scientific Instruments, v. 42, n. 7, p. 169-170, 1971. ISSN 00346748.

ROCHA, C. R. Desenvolvimento de método para análise de leite por espectrometria de fluorescência de raios X por reflexão total. Dissertação. Mestrado em química. Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brasil, 2015.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos. 2a. ed. Campinas, São Paulo: Casa do Pão, 2009.

SCHMITT-JANSEN, M.; VEIT, U.; DUDEL, G. & ALTENBURGER, R. (2008) - An ecological perspective in aquatic ecotoxicology: Approaches and challenges. *Basic and Applied Ecology*, 9(4): 337-345. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.baae.2007.08.008>>. Acesso em: 01/08/2022.

SEEBAUGH, D. R.; GOTO, D.; WALLACE, W. G. Bioenhancement of cadmium transfer along a multi-level food chain. *Marine Environmental Research*, v.59, p.473-491, 2005.

SILVA, EDILAINÉ BASTOS. A CONTAMINAÇÃO DOS LENÇÓIS FREÁTICOS PROVENIENTES DO USO DE AGROTÓXICOS, 2009 Graduanda em Direito pela AJES – Faculdade de Ciências Contábeis e de Administração, IX Termo.

SILVA, R. M. C.; NASCIMENTO FILHO, V. F.; APPOLONI, C. R. Fluorescência de Raios-X por dispersão em energia. 2004 (Publicação Técnica do Laboratório de Física Nuclear Aplicada. DFIS/CCE/UDEL - LFNA - PT01/20043. Disponível em: <<http://www.fisica.uel.br/gfna>>. Acesso em: 15/05/2022.

SKOOG, D.A.; HOLLER F.J.; NIEMAN, T.A. Princípios de análise instrumental. 5ed. São Paulo: Bookman. p. 836. 2002.

SKOOG, WEST, HOLLER, CROUCH, Fundamentos de Química Analítica, Tradução da 8ª Edição norte-americana, Editora Thomson, São Paulo-SP, 2006.

SPRADA, Edilmere. Toxicologia. Curitiba: Instituto Federal do Paraná, 2013. p. 140.

STOSNACH H. Analytical determination of selenium in medical samples, staple food and dietary supplements by means of total reflection X-ray fluorescence spectroscopy. *Spectrochim Acta B*. 2010;65:859-63.

SZOBOSZLAIN, POLGÁRI Z, MIHUCZ VG, ZÁRAY G. Recent trends in total reflection X-ray fluorescence spectrometry for biological applications. *Anal Chim Acta*. 2009 Feb 2;633(1):1-18. doi: 10.1016/j.aca.2008.11.009. Epub 2008 Nov 14. PMID: 19110110.

Tabela brasileira de composição de alimentos / NEPA – UNICAMP - 4. ed. rev. e ampl.. -- Campinas: NEPA- UNICAMP, 2011.

TAHARA, S. Planejamento de experimentos (doe), 2008. Disponível em: <<http://www.portaldeconhecimentos.org.br/index.php/por/Conteudo/>> Acesso em: 09/09/2022.

TARSOLY, G., OVARI, M., AND ZARAY, GY. (2010) Determination of fluorine by total reflection X-ray fluorescence spectrometry. *Spectrochim. Acta B Atom. Spectros*.

THOMPSON, L.J. Lead. In: *Veterinary Toxicology, Basic and Clinical Principles*, Gupta, R.C. (ed). Academic Press, Nova York, 2007.

VARGA I, SZEBENI A, SZOBOSZLAIN, KOVÁCS B. Determination of trace elements in human liver biopsy samples by ICP-MS and TXRF: hepatic steatosis and nickel accumulation. *Anal Bioanal Chem*. 2005;383(3):476-82. doi: 10.1007/s00216-005-0010-0. Epub 2005. PMID: 16158303.

WHO, 2002. Report of the 34th session of the codex committee on food additives and contaminants. Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Codex Alimentaris Commission, ALINORM 03/12, FAO, Rome, Italy. Wlostowski, T., Bonda, E., Krasowska, A., 2006. Free-ranging European.

WISE, C.F., WISE, S.S., THOMPSON, W.D., ET AL.: Chromium Is Elevated in Fin Whale (*Balaenoptera physalus*) Skin Tissue and Is Genotoxic to Fin Whale Skin Cells. *Biol Trace Elem Res.* 166(1): 108–117, 2015.

YOKEL, R.A. The metabolism and toxicokinetics of aluminum relevant to neurotoxicity. In: Yasui, M., Strong, M.J., Ota K., Verity, A.M. (eds). *Mineral and Metal Neurotoxicology*. BocaRaton, FL: CRC Press; 1997:81–89.

YONEDA, Y.; HORIUCHI, T. Optical flats for use in x-ray spectrochemical microanalysis.

YOU DEN, W. J.; STEINER, E. H. *Statistical Manual of the AOAC*. Arlington, Virginia: Association of Official Analytical Chemists, 1975. 96 p.

## ANEXOS

### ANEXO A – Massas utilizadas nas etapas do preparo da amostra no planejamento Fatorial.

Ensaio	Massa Fígado(g)	Massa HNO3 (g)	Massa padrão multielementar (g)	Massa PI Ga (g)	Massa de água (g)	Concentração do ácido(%V.V-1)
1	2,0361	8,3698	0,4165	0,1020	0,8161	15,0
2	2,0853	4,2080	0,4140	0,1013	5,0000	15,0
3	2,1534	8,3321	0,4170	0,1014	0,7996	5,0
4	2,2778	4,2434	0,4180	0,1028	0,8011	5,0
5	2,1012	6,1296	0,4116	0,1010	0,8012	10,0
6	2,0786	6,6021	0,4110	0,1025	0,7989	10,0
7	2,0372	6,1633	0,4111	0,1025	0,8009	10,0
8	2,0054	6,1786	0,0000	0,1024	0,8008	10,0
9	0,0000	6,1561	0,0000	0,1009	0,8000	10,0

### ANEXO B – Concentração da solução ácida utilizada nas etapas do preparo da amostra no planejamento fatorial.

Ensaio	Concentração do ácido(%V.V-1)
1	15
2	15
3	5
4	5
5	10
6	10
7	10
8	10
9	10

## ANEXO C – Composição de alimentos por 100 gramas de parte comestível.

**Tabela 1. Composição de alimentos por 100 gramas de parte comestível: Centesimal, minerais, vitaminas e colesterol**

Número do Alimento	Descrição dos alimentos	Umidade (%)	Energia		Proteína (g)	Lipídeos (g)	Colesterol (mg)	Carbo- idrato		Fibra		Cálcio (mg)	Magnésio (mg)
			(kcal)	(kJ)				(g)	(g)	(g)	(g)		
341	Carne, bovina, contra-filé de costela, cru	66,4	202	847	19,8	13,1	52	0,0	NA	1,0	3	14	
342	Carne, bovina, contra-filé de costela, grelhado	52,2	275	1150	29,9	16,3	98	0,0	NA	1,2	4	24	
343	Carne, bovina, contra-filé, com gordura, cru	65,7	206	861	21,2	12,8	73	0,0	NA	0,9	4	18	
344	Carne, bovina, contra-filé, com gordura, grelhado	51,7	278	1163	32,4	15,5	144	0,0	NA	1,2	4	19	
345	Carne, bovina, contra-filé, sem gordura, cru	69,1	157	655	24,0	6,0	59	0,0	NA	1,0	4	21	
346	Carne, bovina, contra-filé, sem gordura, grelhado	57,5	194	810	35,9	4,5	102	0,0	NA	1,3	5	21	
347	Carne, bovina, costela, assada	43,2	373	1561	28,8	27,7	95	0,0	NA	1,0	28	20	
348	Carne, bovina, costela, crua	52,7	358	1497	16,7	31,8	44	0,0	NA	0,9	*	12	
349	Carne, bovina, coxão duro, sem gordura, cozido	58,5	217	906	31,9	8,9	71	0,0	NA	0,9	4	14	
350	Carne, bovina, coxão duro, sem gordura, cru	69,8	148	619	21,5	6,2	60	0,0	NA	1,1	3	21	
351	Carne, bovina, coxão mole, sem gordura, cozido	58,0	219	915	32,4	8,9	84	0,0	NA	1,2	4	13	
352	Carne, bovina, coxão mole, sem gordura, cru	68,6	169	707	21,2	8,7	84	0,0	NA	1,0	3	21	
353	Carne, bovina, cupim, assado	48,4	330	1381	28,6	23,0	91	0,0	NA	1,0	8	18	
354	Carne, bovina, cupim, cru	64,8	221	926	19,5	15,3	51	0,0	NA	0,9	4	13	
355	Carne, bovina, figado, cru	71,3	141	590	20,7	5,4	393	1,1	NA	1,5	4	12	
356	Carne, bovina, figado, grelhado	55,0	225	942	29,9	9,0	601	4,2	NA	2,0	6	10	
357	Carne, bovina, filé mingnon, sem gordura, cru	71,9	143	598	21,6	5,6	55	0,0	NA	1,1	3	21	
358	Carne, bovina, filé mingnon, sem gordura, grelhado	57,0	220	919	32,8	8,8	103	0,0	NA	1,3	4	28	
359	Carne, bovina, flanko, sem gordura, cozido	62,0	196	818	29,4	7,8	62	0,0	NA	0,9	4	14	
360	Carne, bovina, flanko, sem gordura, cru	72,1	141	592	20,0	6,2	50	0,0	NA	1,0	3	18	
361	Carne, bovina, fraldinha, com gordura, cozida	49,7	338	1416	24,2	26,0	65	0,0	NA	0,7	3	14	
362	Carne, bovina, fraldinha, com gordura, crua	65,4	221	924	17,6	16,1	54	0,0	NA	0,9	3	16	
363	Carne, bovina, tagarto, cozido	57,6	222	931	32,9	9,1	56	0,0	NA	0,9	4	13	
364	Carne, bovina, tagarto, cru	71,0	135	564	20,5	5,2	56	0,0	NA	1,1	3	20	
365	Carne, bovina, língua, cozida	53,4	315	1318	21,4	24,8	105	0,0	NA	0,7	6	12	
366	Carne, bovina, língua, crua	65,0	215	901	17,1	15,8	118	0,0	NA	0,8	5	15	
367	Carne, bovina, maminha, crua	70,0	153	639	20,9	7,0	51	0,0	NA	1,0	3	16	
368	Carne, bovina, maminha, grelhada	65,3	153	641	30,7	2,4	88	0,0	NA	1,4	4	21	
369	Carne, bovina, miolo de alcatra, sem gordura, cru	69,5	163	681	21,6	7,8	60	0,0	NA	1,0	3	20	
370	Carne, bovina, miolo de alcatra, sem gordura, grelhado	52,4	241	1010	31,9	11,6	92	0,0	NA	1,2	5	26	
371	Carne, bovina, músculo, sem gordura, cozido	62,8	194	811	31,2	6,7	56	0,0	NA	0,9	5	13	
372	Carne, bovina, músculo, sem gordura, cru	72,4	142	592	21,6	5,5	51	0,0	NA	1,0	4	17	

Fonte: Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO, em sua 4ª edição revisada e ampliada.

## ANEXO D – Composição de alimentos por 100 gramas de parte comestível.

**Tabela 1. Composição de alimentos por 100 gramas de parte comestível: Centesimal, minerais, vitaminas e colesterol**

Número do Alimento	Manganês (mg)	Fósforo (mg)	Ferro (mg)	Sódio (mg)	Potássio (mg)	Cobre (mg)	Zinco (mg)	Retinol (µg)	RE (µg)	RAE (µg)	Tiamina (mg)	Riboflavina (mg)	Piridoxina (mg)	Niacina (mg)	Vitamina C (mg)
341	Tr	164	1,6	39	245	0,04	4,4	3	3	3	0,14	0,08	Tr	Tr	2,68
342	0,01	252	2,8	51	383	0,08	6,7	Tr	Tr	Tr	Tr	0,19	0,17	Tr	2,75
343	0,01	164	1,3	44	285	0,04	2,8	4	4	4	0,11	0,08	0,03	Tr	3,79
344	Tr	219	2,4	57	352	0,09	4,8	Tr	Tr	Tr	Tr	0,18	0,13	Tr	4,91
345	Tr	184	1,7	53	335	0,05	3,2	Tr	Tr	Tr	Tr	0,20	Tr	Tr	4,64
346	Tr	241	2,4	58	386	0,09	5,1	Tr	Tr	Tr	Tr	0,17	0,16	Tr	4,93
347	Tr	179	2,2	92	270	0,08	5,5	Tr	Tr	Tr	Tr	0,08	0,35	Tr	0,56
348	Tr	130	1,2	70	151	Tr	2,7	5	5	5	0,12	0,11	Tr	Tr	5,99
349	Tr	189	1,7	41	252	0,07	5,0	2	2	2	Tr	Tr	Tr	Tr	3,26
350	Tr	189	1,9	49	358	0,05	2,8	2	2	2	0,12	0,20	Tr	Tr	4,38
351	Tr	183	2,6	44	239	0,11	4,7	2	2	2	Tr	Tr	Tr	Tr	4,09
352	Tr	175	1,9	61	335	0,05	2,6	3	3	3	0,12	0,19	Tr	Tr	2,32
353	Tr	212	2,7	72	321	0,08	5,3	Tr	Tr	Tr	Tr	0,08	0,14	Tr	2,16
354	Tr	220	1,1	47	151	0,03	2,4	3	3	3	0,11	0,05	0,03	Tr	3,33
355	0,26	334	5,6	76	265	9,01	3,5	7937	7937	7937	0,14	0,90	Tr	Tr	10,66
356	0,22	420	5,8	82	309	12,58	4,0	14574	14574	14574	0,21	2,69	Tr	Tr	11,92
357	0,01	193	1,9	49	322	0,08	2,8	4	4	4	0,12	0,10	0,04	Tr	1,78
358	0,02	308	2,9	58	326	0,14	4,1	Tr	Tr	Tr	0,03	0,08	0,05	Tr	4,27
359	Tr	181	2,8	42	249	0,07	5,6	2	2	2	Tr	Tr	Tr	Tr	2,32
360	Tr	167	1,6	54	324	0,05	4,5	2	2	2	0,11	0,16	Tr	Tr	3,28
361	Tr	161	2,0	39	207	0,07	6,5	Tr	Tr	Tr	Tr	0,05	0,07	Tr	1,61
362	0,00	131	1,5	51	274	0,04	4,2	5	5	5	0,08	0,07	0,03	Tr	3,56
363	Tr	167	1,9	48	254	0,05	7,0	3	3	3	Tr	Tr	Tr	Tr	2,55
364	Tr	185	1,3	54	362	0,05	2,4	2	2	2	0,10	0,14	0,03	Tr	2,19
365	0,01	136	2,1	59	175	0,08	4,1	Tr	Tr	Tr	Tr	0,08	Tr	Tr	1,83
366	0,02	164	1,7	73	251	0,09	2,9	Tr	Tr	Tr	0,05	0,04	Tr	Tr	1,18
367	Tr	181	1,1	37	274	0,03	3,5	3	3	3	0,12	0,08	0,03	Tr	4,27
368	Tr	237	2,4	58	386	0,08	5,6	Tr	Tr	Tr	Tr	0,04	0,13	Tr	1,46
369	0,01	165	2,0	43	299	0,06	3,0	4	4	4	0,12	0,07	Tr	Tr	3,59
370	0,02	279	3,2	52	385	0,11	4,8	Tr	Tr	Tr	0,03	0,05	0,05	Tr	4,66
371	Tr	176	2,4	62	253	0,08	6,4	2	2	2	Tr	Tr	Tr	Tr	1,97
372	Tr	162	1,9	66	296	0,05	3,7	2	2	2	0,09	0,19	0,04	Tr	2,79

Fonte: Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO, em sua 4ª edição revisada e ampliada.

**ANEXO E – Valores pesados em cada ensaio do planejamento de experimentos para o procedimento de preparo de amostra.**

Ensaio	Massa Fígado(g)	Massa HNO <sub>3</sub> (g)	Massa padrão multielementar (g)	Aliq. Inicial (g)	Massa PI Ga (g)	Massa de água (g)	Alíquota (g)	Correção do Padrão multielementar (mg/Kg)
1	2,0361	8,3698	0,4165	0,1012	0,1020	0,8161	0,0187	20,31
2	2,0853	4,2080	0,4140	0,0951	0,1013	0,8012	0,0296	18,93
3	2,1534	8,3321	0,4170	0,1074	0,1014	0,7996	0,0210	20,62
4	2,2778	4,2434	0,4180	0,0899	0,1028	0,8011	0,0297	16,60
5	2,1012	6,1296	0,4116	0,0941	0,1010	0,8012	0,0230	18,50
6	2,0786	6,6021	0,4110	0,1377	0,1025	0,7989	0,0303	26,20
7	2,0372	6,1633	0,4111	0,1001	0,1025	0,8009	0,0236	20,13
8	2,0054	6,1786	0,0000	0,1009	0,1024	0,8008	0,0246	0,00
9	0,0000	6,1561	0,0000	0,1038	0,1009	0,8000	0,1033	0,00

Fonte: O próprio autor