

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE QUÍMICA

FÁBIO HENRIQUE WEILER

**AVALIAÇÃO DE NOVA METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE
ELEMENTOS-TRAÇOS EM CARNE DE AVE**

Porto Alegre, 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

FÁBIO HENRIQUE WEILER

**AVALIAÇÃO DE NOVA METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE
ELEMENTOS-TRAÇOS EM CARNE DE AVE**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado junto à atividade de ensino
“Projeto Tecnológico” do curso de
Química Industrial, como requisito parcial
para obtenção grau de Químico Industrial.

Prof^ª. Dr^ª. Dirce Pozebon
Orientadora

Porto Alegre, 2013

AGRADEÇO a minha orientadora pela oportunidade e pela orientação no desenvolvimento desse trabalho. Aos meus pais Lírio e Elaine pelo amor e incentivo de continuar os estudos. Aos meus irmãos Celson pelos conselhos e por todo o apoio, ao André pela amizade e ao Roberto pelo companheirismo. A minha noiva Vanessa pelo carinho e paciência durante toda essa caminhada. A minha vó Lúcia pelas orações. E aos meus colegas e amigos da Ufrgs, Camila, André, Anildo e Rafael como também aos amigos do Lanagro, Maria Aparecida, Rosmari e Gislaíne.

RESUMO

A carne de frango é uma importante fonte de proteína animal, pois, além de não possuir um custo elevado, é produzida em curto prazo de tempo e em espaços físicos reduzidos. O Brasil é um dos maiores produtores e exportadores de carne de ave e o controle da mesma quanto à contaminação é uma exigência a nível mundial. A contaminação por cádmio, chumbo e arsênio é preocupante, pois esses elementos mesmo em pequenas quantidades são prejudiciais à saúde humana. No Brasil, o Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO) é o principal responsável pelo controle de contaminantes em carne de frango. O desenvolvimento de novos métodos de determinação de cádmio, chumbo e arsênio em carne de aves, ou melhoramento dos métodos oficiais já utilizados no LANAGRO, permitirá um maior controle desses contaminantes. Atualmente, a determinação de cádmio, chumbo e arsênio é feita em duas matrizes, no rim e no músculo das aves; o cádmio e o chumbo através da espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GF AAS) e o arsênio por espectrometria de absorção atômica por geração de hidretos (HG AAS). No presente trabalho foi investigado a possibilidade de substituição das duas matrizes (músculo e rim de aves) por somente uma, o fígado, visando-se a determinação de cádmio, arsênio e chumbo nesta matriz. Sendo assim, o método oficial do LANAGRO, para a determinação de cádmio e chumbo em músculo de ave e arsênio em rim de ave foi validado para a determinação dos três elementos no fígado. Com base nos resultados obtidos, constatou-se a possibilidade da utilização do fígado como única matriz. Além disso, avaliaram-se outras formas de preparar as amostras de fígado: digestão em forno de micro-ondas ou preparação de suspensão com hidróxido de tetrametilamonio (TMAH), com possibilidade de determinar os três elementos por GF AAS. Conclui-se que a amostra de fígado pode ser preparada mediante os dois métodos avaliados, para a determinação de cádmio e chumbo por GF AAS. No entanto, os resultados para arsênio não foram satisfatórios e estudos adicionais fazem-se necessários.

Palavras-chave: carne de frango, contaminantes inorgânicos, espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos.

LISTA DE ABREVIACOES

AAS - Espectrometria de absorção atômica (do inglês, *atomic absorption spectrometry*)

CV - Coeficiente de variação

EDL - Lâmpada de descarga sem eletrodo (do inglês, *electrodeless discharge lamp*)

EURACHEM - *Analytical Chemistry Group*

GF AAS - Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (do inglês, *graphite furnace atomic absorption spectrometry*)

HG AAS - Espectrometria de absorção atômica por geração de hidretos (do inglês, *hydride generation atomic absorption spectrometry*)

ISO - *International Standardization Organization*

LANAGRO - Laboratório Nacional Agropecuário

LCO - Lâmpada de cátodo oco

LD - Limite de detecção

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MRC - Material de referência certificado

NIST - *National Institute of Standards and Technology*

PNCRC - Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes

TMC - Teor máximo de contaminante

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Programa de temperatura e tempo do forno de grafite para determinação de Cd, Pb e As	21
Tabela 2: Programa do forno de micro-ondas	21
Tabela 3: Programa inicial da mufla usado para secagem e calcinação das amostras de fígado de ave.	23
Tabela 4: Programa final da mufla usado para a secagem e calcinação das amostras de fígado de ave.	23
Tabela 5: TMC e níveis de fortificação da “matriz branca”.	25
Tabela 6: Intervalo de aceitação do fator de recuperação.	26
Tabela 7: Critérios de aceitabilidade da reprodutividade.	28
Tabela 8: Recuperação do analito adicionado à matriz de fígado ave.....	31
Tabela 9: Valores do desvio-padrão, CV calculado e CV tabelado.	32
Tabela 10: Desvio padrão quadrático (S^2) dos resultados encontrados para os diferentes níveis de concentração.	34
Tabela 11: Comparação dos valores de t para os diferentes níveis de concentração.	34
Tabela 12: Resultado da análise de material de referência certificado (fígado bovino).	35
Tabela 13: Recuperação do analito adicionado à matriz de fígado de ave.....	35
Tabela 14: Recuperação do analito adicionado à matriz de fígado de ave.....	36
Tabela 15: Resultado da análise de material de referência certificado (fígado bovino).	37
Tabela 16: Reagentes e gases utilizados para a execução do método oficial e respectivos custos.	41
Tabela 17: Custos dos reagentes e gases utilizados para a execução do método em que a amostra é analisada na forma de suspensão com hidróxido de tetrametilamônio (TMAH).	42
Tabela 18: Custos dos reagentes e gases utilizados para a execução do método em que a amostra é digerida em forno de micro-ondas.	42

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1 A CARNE DE FRANGO	10
1.2 CONTAMINANTES INORGÂNICOS	11
1.2.1 Arsênio	11
1.2.2 Cádmio	12
1.2.3 Chumbo	13
1.3 TÉCNICAS PARA DETERMINAÇÃO DE ARSÊNIO, CÁDMIO E CHUMBO	14
1.3.1 Espectrometria de absorção atômica por geração de hidretos (HG AAS)	14
1.3.2 Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS).....	15
1.4 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA	16
2. SITUAÇÃO ATUAL	17
3. OBJETIVO	17
4. PROPOSTA TECNOLÓGICA	18
5. METODOLOGIA	18
5.1 MATERIAIS E REAGENTES.....	18
5.2 LIMPEZA DO MATERIAL	19
5.3 EQUIPAMENTOS	19
5.4 AMOSTRAS	21
5.5 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	21
5.5.1 Digestão das Amostras para Determinação de Arsênio.....	21
5.5.2 Digestão das Amostras para Determinação de Cádmio e Chumbo	22
5.5.3 Suspensão	23
5.5.4 Digestão Assistida por Radiação Micro-ondas.....	23
5.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO	23
5.6.1 Estudo da Recuperação/Veracidade	24
5.6.1.1 Procedimento de Determinação da Recuperação	24
5.6.1.2 Critérios de Aceitação da Recuperação	25
5.6.2 Precisão.....	25

5.6.2.1 Repetitividade.....	26
5.6.2.2 Procedimento de Determinação da Repetitividade.....	26
5.6.2.3 Critérios de Aceitação da Precisão	26
5.6.3 Estudo da Seletividade pelo Efeito da Matriz	27
5.6.3.1 Procedimento de Determinação do Efeito de Matriz.....	28
5.6.3.2 Critérios de Aceitação	28
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
6.1 RECUPERAÇÃO.....	30
6.2 REPETITIVIDADE	31
6.3 EFEITO DE MATRIZ.....	32
6.4 SUSPENSÃO	34
6.5 DIGESTÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS.....	35
6.6 ESTUDO DO PROGRAMA DO FORNO DE GRAFITE	36
7. AVALIAÇÃO DE CUSTOS.....	38
7.1 AVALIAÇÃO DA METODOLOGIA OFICIAL	39
7.2 COMPARAÇÃO DOS CUSTOS.....	39
8. CONCLUSÃO.....	42
9. PERSPECTIVAS.....	42
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	43

1. INTRODUÇÃO

Segundo a FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) a população mundial atingirá 9 bilhões de habitantes em 2050, o que aumentará a demanda de alimentos. Um dos grandes desafios é produzir quantidade suficiente de alimentos e de qualidade.

Desta forma, uma das preocupações no setor alimentício está relacionada com a contaminação dos alimentos por resíduos de pesticidas e contaminantes inorgânicos.

A inspeção da qualidade dos alimentos é de fundamental importância para a saúde da população, assim como para controle de produção nacional. No entanto, os métodos analíticos utilizados precisam ser validados. A validação consiste em comprovar a eficiência e a qualidade do método (GONZÁLES, A. G.; HERRADOR, M. A., 2007). Os parâmetros utilizados para tal, segundo a literatura (ALBANO, F. M.; RAYA-RODRIGUES, M. T., 2009), são a exatidão, precisão (repetitividade e reprodutibilidade), linearidade, faixa de trabalho, seletividade, incerteza de medição, estabilidade, os limites de quantificação e de detecção e a robustez.

A determinação de contaminantes inorgânicos tais como cádmio (Cd), chumbo (Pb) e arsênio (As) em alimentos, como carne de aves é feita por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS) e por espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (HG AAS), esta para o As. O uso dessas técnicas, já consolidadas e oficiais pelo Ministério da Agricultura Pecuária e abastecimento (MAPA), pode ser aprimorado, o que foi o objetivo do presente trabalho.

A proposta desse projeto foi aprimorar um método já validado, a fim de substituir a utilização de duas matrizes (rim e músculo) por uma apenas (fígado). Como não se trata de uma nova validação, foi necessário avaliar somente alguns parâmetros: a recuperação (exatidão), repetitividade (precisão) e efeito de matriz (seletividade). Essa nova proposta tem o conveniente de poderem ser determinados os três elementos numa única matriz e, assim, realizou-se a avaliação dos parâmetros mediante a técnica de GF AAS. No entanto, mediante essa técnica não foram obtidos resultados satisfatórios para As.

Nesse trabalho também foram avaliadas duas formas alternativas de preparação da amostra: digestão em forno de microondas e preparação de suspensão. Estas tem inúmeras vantagens, como redução de custos de reagente, tempo de análise assim como menor geração de resíduos, quando comparadas com aquelas recomendadas pelo método oficial. Foram obtidos resultados satisfatórios para Cd e Pb, o que não ocorreu para o As. No entanto, isso foi devido ao efeito de matriz na técnica de medição (GF AAS) e não ao método de análise. Por fim, foi feito um estudo de custos e fez-se um comparativo entre os métodos.

1.1 A CARNE DE FRANGO

A arte de criar aves é uma das atividades pecuárias mais antigas e existem relatos de que de há mais de 4000 mil anos os povos de Extremo Oriente conseguiam prender e domesticar algumas espécies de aves selvagens (<http://www.fdr.com.br>, acesso em 23/11/2013). Acredita-se que a ave tenha chegado ao Brasil em 1503, mas a produção comercial surgiu em Minas Gerais, por volta de 1860, quando o estado começou a enviar aves e laticínios para outras regiões do país (<http://www.aviculturaindustrial.com.br>, acessado em 23/11/2013).

Até o início do século XX a criação de frango era campestre no Brasil. As aves viviam soltas e demoravam mais de seis meses para atingir o peso de abate, na faixa de 2,5 kg. O processo de modernização e de produção em escala começou na década de 30 em função da necessidade de abastecer os mercados que já eram grandes na época. A partir dos anos 50, a avicultura brasileira ganhou impulso com o melhoramento genético, com o desenvolvimento de vacinas, nutrição e equipamentos específicos para a criação dos animais. As grandes agroindústrias avícolas brasileiras ganharam estrutura a partir dos anos 60 (<http://www.aviculturaindustrial.com.br>, acessado em 23/11/2013).

O Brasil é hoje um dos maiores exportadores de carne no mundo. Nos últimos anos, o país firmou-se no mercado mundial de carnes, onde a carne de frango se destaca. Os principais produtores de frango são os Estados Unidos, a China e o Brasil, sendo que os maiores consumidores são os Estados Unidos, a China, a União Européia e o Brasil. A

produção brasileira em 2009 ultrapassou 11 milhões de toneladas, sendo 30% deste montante exportados (<http://www.abef.com.br>, acessado em 03/08/13).

A avicultura no Brasil se destaca no complexo de proteína animal por ser considerada a mais dinâmica e tecnicamente controlada, pois hoje os frangos de corte são abatidos com cerca de 37 dias de idade e peso médio de 2,4 kg.

No Brasil, a carne de aves, por se tratar de um importante produto comercial, é submetida a uma rigorosa fiscalização no que diz respeito a contaminantes inorgânicos nocivos à saúde do consumidor, mais especificamente, o arsênio, cádmio e chumbo, de maior controle por parte do MAPA.

Atualmente, o Brasil conta com o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), amparado pela Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários (LANAGROs), cujo objetivo é apoiar as ações de fiscalização de Secretaria de Defesa Agropecuária em toda a extensão da cadeia produtiva alimentar. O PNCRC define limites máximos de resíduos de pesticidas e contaminantes inorgânicos, incluindo As, Cd e Pb. Os limites de tolerância para tecido animal, incluindo as aves, são: $1,0 \mu\text{g g}^{-1}$ de As; $0,50 \mu\text{g g}^{-1}$ de Cd e $0,50 \mu\text{g g}^{-1}$ de Pb (PNCRC-Animal, 2013).

1.2 CONTAMINANTES INORGÂNICOS

Os contaminantes inorgânicos constituem uma das maiores fontes poluidoras dos solos e água. Elementos como As, Cd e Pb não são naturalmente encontrados nos organismos vivos e não apresentam nenhum desempenho na função nutricional e bioquímica. Desta forma, mesmo em baixas concentrações esses elementos são considerados prejudiciais à saúde humana. Características importantes dos elementos que são determinados nesse trabalho estão descritas a seguir.

1.2.1 Arsênio

O As é um metalóide que ocorre na forma inorgânica e orgânica e é encontrado no ambiente, tanto naturalmente como em consequência da atividade antrópica. As espécies

inorgânicas de arsênio são mais tóxicas do que as orgânicas, mas até agora a maioria dos dados de ocorrência em alimentos recolhidos no âmbito do controle oficial dos gêneros alimentícios, ainda são relacionados ao teor de As total, sem diferenciar as várias espécies do elemento. A necessidade de dados de especificação é evidente, pois diversas investigações demonstram que, especialmente em frutos do mar, a maior parte do arsênio está presente em formas orgânicas, que são menos tóxicas. Por conseguinte, uma avaliação de risco sem levar em conta as diferentes espécies levaria a uma superestimação considerável do risco de saúde relacionado com a exposição do arsênio na dieta (ESFA).

Várias pesquisas demonstram que o As inorgânico é um indutor genético caracterizado como um agente cancerígeno (FRUMKIN, H.; THUN, M. J., 2001). O As(III) reage com os grupos sulfidrilas de proteínas, afetando a atividade de muitas enzimas que contém esse grupo. Efeitos inibidores do As(III) na respiração mitocondrial determinam efeitos tóxicos críticos (MCSHEEHY, S.; SZPUNAR, J.; MORABITO, R., 2003).

As atividades humanas intensificam a acumulação do arsênio no meio ambiente com a queima de combustíveis fósseis, fundição de metais e utilização do elemento na indústria de semicondutores e de vidro. O arsênio é também um ingrediente de muitos materiais comumente utilizados, incluindo preservativos de madeira, pigmentos, inseticidas, herbicidas, fungicidas e rodenticidas (HATHAWAY, G. J.; PROCTOR, N. H.; HUGHES, J. P., 2005). A utilização de compostos de arsênio na agricultura, silvicultura e nas atividades mineradoras podem contaminar o solo, águas subterrâneas e vegetais (SMEDLEY, P. L.; KINNINGURG, D. G., 2002).

1.2.2 Cádmi

O Cd é um dos cinco elementos mais tóxicos presentes na natureza, não sendo elemento essencial ao homem. Sua presença em tecidos biológicos decorre da contaminação dos alimentos, meio ambiente ou exposição ocupacional. Suas numerosas aplicações industriais e sua capacidade de combinação com outros elementos metálicos (Zn e Cu, principalmente) favorecem a contaminação ambiental (ESFA).

O Cd é encontrado naturalmente e também devido a ações antrópicas, principalmente devido a sua presença em insumos agrícolas. Para os não fumantes e a população em geral, os alimentos são a principal fonte de exposição ao Cd. A absorção do Cd após à exposição alimentar é relativamente baixa (3 a 5%), mas é eficientemente retido nos rins e fígado do corpo humano, com uma meia vida biológica de 10 a 30 anos. O Cd é especialmente tóxico para os rins, acumulando-se nas células tubulares proximais ao longo do tempo, podendo causar disfunção renal. A Agencia Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (IARC) classificou o Cd como um cancerígeno humano, com base em estudos ocupacionais, aumentando o risco de câncer de pulmão, endométrio, bexiga e mama (ESFA).

1.2.3 Chumbo

O chumbo foi um dos primeiros metais que o homem aprendeu a usar. Há evidências que já era utilizado na Ásia Menor 4000 a.C. Por ser utilizado de forma tão intensa e por tão longo tempo, a história de sua intoxicação é extensa. No Império Romano era comum devido ao fato de os canos serem feitos de chumbo, assim como os vasos onde se guardavam os vinhos e alimentos (HENDERSON, J. A.; BLOOD, D. C.; RADOSTITS, O. M., 1983).

O Pb ocorre como contaminante ambiental em consequência de seu amplo emprego industrial, destacando-se a indústria extrativa, petrolífera, de tintas e corantes, cerâmica, gráfica, bélica, entre outros (HENDERSON, J. A.; BLOOD, D. C.; RADOSTITS, O. M., 1983).

A presença de chumbo no ambiente aumenta com a intensificação da urbanização, agricultura e emissões industriais. Na China, a concentração de chumbo na carne, nos ovos e no leite aumentou nos últimos 10 anos, enquanto em países desenvolvidos a contaminação parece ter se estabilizado. Apesar disto, estima-se que nos últimos 30 anos, grandes quantidades de chumbo tenham sido emitidas no ambiente (TAJKARIMI, M.; FAGHIH, M. A.; POURSOLTANI, H., 2008). Assim, o Pb está presente no meio em que o homem vive e a concentração do elemento varia de um local para o outro. A população urbana defronta-se com este problema devido à constante emissão, pelas indústrias ou ainda

pela ingestão de alimentos contaminados (HENDERSON, J. A.; BLOOD, D. C.; RADOSTITS, O. M., 1983).

Foi constatado que o Pb é armazenado nos ossos e é liberado ao longo do tempo, especialmente durante a gravidez, amamentação e após a menopausa. Os principais efeitos do chumbo são exercidos sobre o sistema cardiovascular, renal, imunológico, e reprodutivo. Foi também identificado como possível agente cancerígeno, sendo que o sistema nervoso é especialmente sensível ao Pb (WHITE, L. D.; CORY-SLECHTA, D. A.; GILBERT, M. E., 2007).

No Brasil, o MAPA estabelece um limite máximo de $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$ de Pb, $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$ de Cd e $1,0 \mu\text{g g}^{-1}$ de As no fígado de aves (PNCRC-Animal, 2013).

1.3 TÉCNICAS PARA DETERMINAÇÃO DE ARSÊNIO, CÁDMIO E CHUMBO

A técnica de HG AAS foi utilizada para determinação de As e a técnica de GF AAS foi utilizada para a determinação de Pb e Cd.

1.3.1 Espectrometria de absorção atômica por geração de hidretos (HG AAS)

A HG AAS é, essencialmente, uma técnica de separação química do elemento de interesse (analito) da solução contendo a matriz da amostra, a qual, freqüentemente, interfere no sinal do analito. Elementos como arsênio, selênio e antimônio produzem hidretos com características covalentes mais pronunciadas e de relevante estabilidade, sendo gerados e transportados até a célula de atomização com alta eficiência (DEDINA, J.; TSALEV, D. L., 1995).

A HG AAS associada a uma célula de quartzo (atomizador) pode garantir menores limites de detecção de As que aqueles obtidos por GF AAS. Devido às condições específicas do detector (AAS), a capacidade da HG AAS é geralmente restrita à análise monoelementar (DEDINA, J.; TSALEV, D. L., 1995).

O uso dessa técnica especificamente para a quantificação de arsênio possui, pelo menos, dois benefícios principais: o arsênio é separado como um gás a partir da matriz da amostra, reduzindo assim a interferência do efeito da matriz e é muito mais eficientemente

transportado para o instrumento na fase gasosa do que na fase líquida, melhorando a sensibilidade (MORRETO, A.L., 2001).

O hidreto pode ser gerado através do uso de agente redutor, sendo um dos mais usados o tetraidroborato de sódio (NaBH_4) em meio ácido (SMEDLEY, P. L.; KINNINGURG, D. G., 2002), conforme resumido pelas equações (1) e (2).



As soluções de NaBH_4 são geralmente preparadas diariamente em solução básica, por exemplo, em NaOH 0,05 a 0,1% (m/v), para melhor estabilidade do reagente (TAKASE, I.; PEREIRA, H.B.; LUNA, A.S., 2002).

Na HG AAS é utilizado um atomizador aquecido a 900 °C, onde os hidretos de arsênio são decompostos e é produzido arsênio livre, absorvendo a radiação da fonte em 193,7 nm. (POLETTI, J., 2012)

Para a determinação do arsênio inorgânico total é necessário efetuar a redução do As(V) para As(III) , com a utilização de agentes redutores como o iodeto de potássio (KI). O KI é utilizado na presença de ácido ascórbico que tem a finalidade de prevenir a oxidação do iodeto pelo ar atmosférico (BARRA, C.M.; SANTELLI, R.E.; GUARDIA, M., 2000).

1.3.2 Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS)

A GF AAS também é conhecida como espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (LIMA, V.S., 2011). Na atomização eletrotérmica, a amostra é introduzida no forno ou câmara (tubo) de grafite, a qual é submetida a um aquecimento progressivo previamente programado. A temperatura do tubo aumenta à medida que se aumenta a diferença de potencial e corrente aplicados aos contatos do tubo de grafite, sendo o calor desenvolvido por efeito Joule (RIDDLE, C., 1993).

Durante a atomização os átomos presentes na amostra são levados ao estado fundamental. Uma lâmpada de cátodo oco (LCO) ou de descarga sem eletrodo (EDL) emite radiação no comprimento de onda específico do analito e os átomos do analito absorvem

parte dessa radiação passando para o estado excitado. A quantidade de energia absorvida é proporcional à concentração de analito na amostra e pode ser medida através da quantidade da radiação da fonte que chega ao detector antes e após a absorção pelo analito (SILVA, Jr, A.I.; BIDART, A.M.F.; CASELLA, R. J., 2011).

Ao se utilizar a GF AAS, é de fundamental importância o uso de modificador químico, que tem como principal função separar e eliminar a matriz durante a etapa de pirólise, fixando o analito no tubo de grafite até a etapa de atomização, permitindo assim a eliminação de maior parte da matriz. O modificador químico pode ser colocado sobre a amostra no tubo de grafite, através do pipetador automático, pipetando em seqüência, modificador e amostra. Além disso, o modificador químico pode ser permanente no tubo de grafite. Os modificadores químicos comumente usados, na forma de solução, são o Pd, $Mg(NO_3)_2$, $NH_4H_2PO_4$ e misturas desses (ATZ, V.L., 2008).

A GF AAS é uma técnica seletiva e de boa sensibilidade, sendo, portanto, apropriada para determinar baixas concentrações de elementos em vários tipos de amostras líquidas e sólidas, como no caso de Cd e Pb (ATZ, V.L., 2008).

1.4 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA

O objetivo de se avaliar um método analítico é assegurar que em uma análise de rotina serão obtidos resultados confiáveis. Apenas uma comparação dos resultados obtidos mediante o método em questão, com valores certificados para materiais de referência, não é o suficiente. O objetivo de uma validação não é simplesmente a obtenção da veracidade de um resultado, mas também avaliar os riscos que podem ser expressos pela incerteza da medida associada com este resultado (GONZÁLES, A. G.; HERRADOR, M. A., 2007).

Um método deve ser validado quando surge a necessidade de se verificar a adequação de seu desempenho em relação a uma nova situação analítica, ou quando ocorre a extensão de escopo de um método já validado, ou mesmo quando um aprimoramento é incorporado ao sistema, entre outros (EURACHEM.,1998).

Existem critérios bem definidos para a validação de métodos analíticos, com evidências objetivas. Estes são: precisão (repetitividade e reprodutibilidade), exatidão, linearidade, faixa de trabalho, seletividade, incerteza da medição, estabilidade, limites de

deteção e quantificação e robustez (ALBANO, F. M.; RAYA-RODRIGUES, M. T., 2009).

2. SITUAÇÃO ATUAL

Os limites máximos de contaminantes inorgânicos estão definidos no Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), onde os limites de tolerância para tecido animal, incluindo as aves de corte a partir da análise do músculo e rim são: $1,0 \mu\text{g g}^{-1}$ de As; $0,50 \mu\text{g g}^{-1}$ de Cd e $0,50 \mu\text{g g}^{-1}$ de Pb (PNCRC-Animal., 2013).

Atualmente, o Laboratório Nacional de Agropecuária (LANAGRO), que é descentralizado do MAPA, está desenvolvendo diversas atividades de inserção ou alteração de escopos e, no caso das aves de corte, existe a possibilidade de se determinar Cd, Pb e As em somente uma matriz, no fígado. Atualmente, no LANAGRO/RS, o Cd e o Pb (em músculo de ave) são determinador por GF AAS, enquanto que o As (em rim de ave) é determinado por HG AAS.

O método de digestão das amostras para determinação de Cd e Pb baseia-se na adição de ácido nítrico (HNO_3) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), sendo primeiramente adicionado o HNO_3 e a mistura aquecida em bloco digestor por 60 minutos. Após resfriar à temperatura ambiente é adicionada uma alíquota de H_2O_2 e a mistura novamente aquecida por 60 minutos. A decomposição de amostra para determinação de As é realizada por calcinação em forno mufla a temperatura de 550°C , onde na primeira queima é adicionada uma alíquota de nitrato de magnésio ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$) e na segundo queima uma alíquota de HNO_3 .

3. OBJETIVO

Este trabalho visa desenvolver e implementar uma metodologia mais eficiente de análise para a determinação de As, Cd e Pb em tecido de aves, melhorando o método já existente. Será avaliada a possibilidade de analisar somente um tipo de tecido ao invés de dois; atualmente são feitas determinações desses elementos no músculo e no rim das aves.

Neste contexto, o objetivo do trabalho é desenvolver um método de análise para o fígado, que substituirá a análise dos rins e músculo.

Para a validação do método foram avaliadas a seletividade (através do efeito de matriz), exatidão (pelo teste de recuperação do analito) e a precisão (pelo teste de repetitividade). Alguns parâmetros foram avaliados mediante a análise com material de referência certificado e outros através da adição de solução padrão de referência certificada.

Neste trabalho também foram investigadas formas alternativas de preparo da amostra: suspensão com hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) e digestão em forno de micro-ondas. Também foram avaliadas as temperaturas de pirólise e atomização do programa de temperatura do forno de grafite.

4. PROPOSTA TECNOLÓGICA

Este trabalho apresenta como proposta tecnológica avaliar a possibilidade de utilização de uma nova metodologia de determinação de elementos traços em carne de aves, investigando-se a possibilidade de utilizar apenas uma matriz para determinação de Cd, Pb e As ao invés de duas que são utilizadas atualmente.

Para a avaliação serão usados critérios já definidos pelo MAPA, para demonstrar a eficiência do método proposto.

Por fim, avaliar e comparar os custos envolvidos na determinação dos elementos pelo MAPA, mediante o método proposto e o oficial.

5. METODOLOGIA

5.1 MATERIAIS E REAGENTES

Foram utilizados reagentes de grau analítico e água purificada (com condutividade de 0,05 μS) através de um ultra purificador (Master System da marca Gehaka). Essa água foi utilizada para a preparação das soluções e amostras. HNO_3 65% (m/m), HCl 37% (m/m), H_2O_2 30%, NaOH 99%, hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) 25% (m/v), ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) 99%, KI 99%, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 98-102%, tetraidroborato de sódio (NaBH_4) 99%, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 10 g L^{-1} e solução de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 g L^{-1} foram utilizados.

As soluções de calibração foram preparadas a partir da diluição de uma solução estoque (Merck) com 1000 mg L^{-1} do analito em água.

O material de referência certificado utilizado foi o *Bovine Liver (1577c)* do *National Institute of Standards and Technology*. Para as fortificações das amostras foram utilizados padrões aquosos da marca Merck, contendo 1000 mg L^{-1} do analito.

5.2 LIMPEZA DO MATERIAL

Os tubos de vidro utilizados na digestão das amostras, os frascos de polipropileno (PP) usados no armazenamento das amostras, os balões volumétricos e os copos béquer foram descontaminados de acordo com o seguinte procedimento: a) enxágue em água corrente por 3 vezes; b) contato com uma solução de detergente neutro 0,5% (v/v) por 24 horas; c) sucessivas lavagens com água corrente; d) imersão em uma solução de HNO_3 10% (v/v) por 24 horas e f) lavagem com água ultrapura. Após isso, o material foi deixado secar.

5.3 EQUIPAMENTOS

Para a determinação do arsênio foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica Analysty 200 com um sistema de injeção de fluxo FIAS/100, equipado com um amostrador automático AS 90 Plus e lâmpada EDL da marca PerkinElmer, operada com uma corrente de 400 mA. Foi utilizado N_2 com pureza de 99,999% de marca IBG como gás de purga, com vazão de $50 - 100 \text{ mL min}^{-1}$. A absorvância do As foi medida em 193,7 nm, para uma fenda espectral de 2,3 nm e tempo de integração de 15 s. O atomizador utilizado foi uma célula de quartzo em forma de T, aquecida a $900 \text{ }^\circ\text{C}$. Utilizou-se NaBH_4 0,4% (m/v) e HCl 10% (v/v), respectivamente, para a geração dos hidretos de As. Para obter a curva de calibração do As foram preparadas soluções de calibração contendo 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10 e $12,5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ do elemento, em HCl 10% (v/v).

A determinação de Cd e Pb, e alguns testes para As, foi realizada por GF AAS, utilizando-se um espectrômetro Analysty 600 em conjunto com um amostrador automático AS 800, ambos da marca PerkinElmer. Como gás de purga e proteção foi utilizado argônio com pureza de 99,999% marca IBG, à vazão de 250 mL min^{-1} . Como fonte de radiação

foram utilizadas lâmpadas de EDL de Cd, Pb e de As, operadas a 230 mA, 440 mA e 400 mA, respectivamente. A absorvância do Cd foi medida em 228,8 nm, a do Pb em 283,3 nm e a do As em 193,7 nm, sendo a fenda espectral 0,7 nm e o tempo de integração 5 s para ambos os elementos. O modificador utilizado foi uma mistura de Pd 0,05% e $Mg(NO_3)_2$ 0,03%. A curva de calibração do cádmio foi preparada mediante soluções de calibração contendo 1, 2, 4, 6, 8 e 10 $\mu g L^{-1}$ do elemento, a de chumbo foi preparada a partir de soluções contendo 20, 40, 60, 80 e 100 $\mu g L^{-1}$ do elemento e a de arsênio foi preparada a partir de soluções contendo 5, 10, 25, 50, 75, 100 $\mu g L^{-1}$ do elemento. Os volumes de solução da amostra e do modificador químico introduzidos no tubo de grafite foram 20 μL e 5 μL , respectivamente. O programa de temperatura e tempo do forno de grafite é citado na Tabela 1.

Tabela 1: Programa de temperatura e tempo do forno de grafite para determinação de Cd, Pb e As.

Etapas	Temperatura °C	Rampa (s)	Patamar (s)	Fluxo de gás ($mL min^{-1}$)
Secagem	110	1	30	250
Secagem	130	15	30	250
Pirólise	700^a; 1000^b; 1200^c	10	20	250
Atomização	1500^a; 1600^b; 2000^c	0	5	0
Limpeza	2450	1	3	250

^a: Cd, ^b: Pb, ^c: As

A decomposição das amostras assistida por micro-ondas foi realizada em um forno Multiwave 3000 da marca Anton Paar, com um rotor para oito tubos de quartzo. O programa usado é citado na Tabela 2.

Tabela 2: Programa do forno de micro-ondas.

Etapas	Potência (W)	Rampa (min)	Patamar (min)	Estagios de Ventilação
1	600	5	10	1
2	1400	10	10	1
3	0		10	3

5.4 AMOSTRAS

As amostras de fígado de ave utilizadas para desenvolvimento do método foram adquiridas aleatoriamente em supermercados locais, sendo usadas preferencialmente amostras que continham baixas concentrações dos elementos estudados, através de análises preliminares, constituindo a “matriz branca”. As amostras de fígado *in natura* de ave foram trituradas e homogeneizadas, colocadas em frasco plástico e armazenadas congeladas (em *freezer*) até o dia da análise.

5.5 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

5.5.1 Digestão das Amostras para Determinação de Arsênio

As amostras de fígado foram decompostas conforme método oficial do LANAGRO. Foram pesados, aproximadamente, 5 g em copo béquer de 25 mL, onde foram adicionados 5 mL de nitrato de magnésio $Mg(NO_3)_2$ 50% (m/v) e a mistura foi aquecida a 90 °C em estufa por cerca de 8 h, até secagem completa da amostra. Posteriormente, as amostras foram calcinadas em mufla, com rampa de aquecimento (Tabela 3), de modo a elevar lentamente a temperatura até 550 °C, permanecendo nessa temperatura por um período de 6 horas. Após esfriar e atingir a temperatura ambiente, foi adicionado 1 mL de HNO_3 50% (v/v), tendo-se o cuidado de lavar as paredes do frasco para remover possíveis resíduos de carbono remanescentes, e a mistura foi levada à secura (sem ferver) em chapa eletricamente aquecida, durante 1 h. Em seguida, as cinzas foram novamente aquecidas (Tabela 4) a 550 °C por 1 h em mufla. Após esfriar e atingir a temperatura ambiente, foram adicionados às cinzas 10 mL de HCl 4,5 mol L^{-1} e a mistura foi aquecida (sem ferver) em chapa elétrica, até a solubilização das cinzas. Repetiu-se por mais duas vezes a adição de 10 mL de HCl 4,5 mol L^{-1} . Finalmente, foram adicionados 2 mL de solução de iodeto de potássio (KI) 7,5% (m/v) + ácido ascórbico 7,5% (m/v) e o volume da solução foi completado com água até 50 mL em frasco graduado.

Para o estudo das temperaturas de pirólise e atomização, foi utilizada uma amostra de fígado *in natura*, digerida com 5 mL de HNO_3 + 2 mL de H_2O_2 em tubo quartzo, no

forno de micro-ondas. Após o término do programa de aquecimento e resfriamento, o volume da solução foi completado a 15 mL com água. Antes da decomposição, foi feita adição dos analitos (com padrão aquoso de referência), a fim de se obter 125 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de Cd, 250 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de Pb e 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de As.

Tabela 3: Programa inicial da mufla usado para secagem e calcinação das amostras de fígado de ave.

Etapas	Temperatura (°C)	Rampa (min)	Patamar (min)
1	100	20	10
2	180	10	30
3	250	20	60
4	350	20	90
5	450	15	30
6	550	15	150
7	0	-	Desligar

Tabela 4: Programa final da mufla usado para a secagem e calcinação das amostras de fígado de ave.

Etapas	Temperatura (°C)	Rampa (min)	Permanencia (min)
1	250	10	30
2	550	15	30
3	0	-	Desligar

5.5.2 Digestão das Amostras para Determinação de Cádmio e Chumbo

As amostras de fígado foram decompostas de acordo com o método oficial, para a determinação de Cd e Pb. Para isso, 2 g de fígado foram pesados em tubo de vidro graduado, onde foram adicionados 5 mL de HNO₃ concentrado. A digestão da amostra foi feita em sistema aberto, onde o tubo foi colocado em um bloco digestor aquecido a 80 °C e a mistura mantida nessa temperatura por 60 min. Após o resfriamento, foram adicionados 2 mL de H₂O₂ e a mistura foi novamente aquecida por mais 60 min. Eventualmente, o tubo contendo a amostra e o ácido era manualmente agitado. A digestão foi finalizada após

observar-se ausência de resíduos da amostra. Após esfriar à temperatura ambiente, o volume foi ajustado para 15 mL com água.

5.5.3 Suspensão

Para a determinação dos Cd, Pb e As, a amostra foi também preparada na forma de suspensão. Foram pesados 30 mg de fígado de ave, em triplicata, diretamente no copo do amostrador automático associado ao espectrômetro GF AAS. Após a pesagem, foram adicionados 500 μ L de água e a mistura foi homogeneizada com o auxílio de uma micropipeta. A seguir, foram adicionados 500 μ L de uma solução de TMAH 25% (m/v) e a suspensão foi novamente homogeneizada com auxílio de uma micropipeta. Finalmente, foram adicionados mais 500 μ L de água e a suspensão novamente homogeneizada. Imediatamente antes de ser pipetada, a suspensão era homogeneizada, também com o auxílio de uma micropipeta (DAMIN, I.C.F., 2009).

5.5.4 Digestão Assistida por Radiação Micro-ondas

Foram pesadas 500 mg da amostra de fígado em frascos de quartzo do forno de micro-ondas. Foram adicionados 5 mL de HNO₃, 1 mL de H₂O₂ e 1 mL de água. Após a adição dos reagentes os frascos foram colocados no rotor e transferidos para o forno de micro-ondas. A digestão da amostra foi efetuada segundo o programa citado na Tabela 2. A solução obtida foi quantitativamente transferida para frasco graduado de polipropileno cujo volume foi completado com água até 15 mL.

5.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

A validação é feita através da verificação de diversos parâmetros. O presente caso não se trata de uma nova validação e sim de uma modificação de um método já validado. Portanto, conforme citado anteriormente, os parâmetros avaliados foram a precisão (através da repetitividade), a seletividade (através do efeito de matriz) e a exatidão (pelo teste de recuperação do analito).

5.6.1 Estudo da Recuperação

A veracidade é a concordância entre a média de um número suficientemente grande de resultados de um ensaio e o valor de referência aceito convencionalmente como “verdadeiro”. A veracidade está inversamente relacionada ao erro sistemático ou ao fator de correção (MANUAL DE GARANTIA DA QUALIDADE ANALÍTICA. MAPA, 2011).

Os testes de recuperação têm como objetivo a avaliação dos resultados das análises, para verificar os erros sistemáticos oriundos dos efeitos de extração ou digestão e das perdas advindas de todas as etapas da marcha analítica, até a resposta instrumental. Não se deve confundir a recuperação do analito com a eficiência de extração ou da digestão da amostra; a recuperação mede a tendência total do método analítico e, portanto, é uma expressão de sua veracidade.

5.6.1.1 Procedimento de Determinação da Recuperação

A recuperação foi avaliada a partir de seis réplicas da matriz da amostra, esta denominada de “matriz branca”. A matriz branca era constituída por varias amostras com baixa concentração do analito, as quais foram homogeneizadas e misturadas. Esta foi fortificada com o analito, em três níveis de concentração: baixa, média e alta, conforme a Tabela 5.

Tabela 5: TMC e níveis de fortificação da “matriz branca”.

TMC	Cádmio ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Chumbo ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Arsênio ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
0,2 TMC	-	-	200
0,4 TMC	200	200	-
1,0 TMC	500	500	1000
1,5 TMC	750	750	1500

O “Teor Máximo de Contaminante” (TMC) para As, Cd e Pb variam conforme a determinação do PNCRC (PNCRC-Animal, 2013) para cada matriz, sendo que o TMC desses elementos em fígado de ave é: $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$ de As, $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ de Cd e $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ de Pb.

O fator de recuperação (*frec*) é calculado pela equação (3):

$$frec = ((c_f - c_{nf}) \times 100) / c_{ad} \quad (3)$$

Onde:

- c_f = concentração medida após fortificação da “matriz branca”;
- c_{nf} = concentração medida na “matriz branca” não fortificada;
- c_{ad} = concentração do analito adicionado à “matriz branca”.

5.6.1.2 Critérios de Aceitação da Recuperação

A recuperação, calculada segundo a equação (3), deve estar compreendida dentro de intervalos específicos por norma ou legislação específica (MANUAL DE GARANTIA DA QUALIDADE ANALÍTICA. MAPA, 2011). A Tabela 6 apresenta os critérios de aceitação para a recuperação, aplicáveis à análise de resíduos e contaminantes em produtos de origem animal.

Tabela 6: Intervalo de aceitação do fator de recuperação.

Concentração (C)	Intervalo (%)
$C \leq 1 \mu\text{g kg}^{-1}$	-50% a +20%
$1 \mu\text{g kg}^{-1} < C < 10 \mu\text{g kg}^{-1}$	-30% a +10%
$C \geq 10 \mu\text{g kg}^{-1}$	-20% a + 10%

Fonte: MANUAL DE GARANTIA DA QUALIDADE DO MAPA, 2011

Segundo a Tabela 6, para o presente trabalho, a faixa de aceitação da recuperação é -20% a + 10% do valor esperado (100%).

5.6.2 Precisão

A precisão é uma estimativa da dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra ou padrões em condições definidas, sendo que uma das

formas de expressar a precisão é por meio da repetitividade (MANUAL DE GARANTIA DA QUALIDADE ANALÍTICA. MAPA, 2011).

5.6.2.1 Repetitividade

A repetitividade é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas. As condições de repetitividade são aquelas em que todos os fatores que podem alterar o resultado da medição são mantidos constantes ou controlados, ou seja, mesmo procedimento de medição, mesmo analista, mesma temperatura, pressão e umidade ambiente, mesmo laboratório, mesmo fornecedor e lote de reagentes e as medições realizadas em curto período de tempo (MANUAL DE GARANTIA DA QUALIDADE ANALÍTICA. MAPA, 2011).

5.6.2.2 Procedimento de Determinação da Repetitividade

Para a determinação da repetitividade a “matriz branca” foi fortificada ao nível de TMC, onde os três níveis de concentração foram 0,2 ou 0,4 TMC; 1,0 TMC e 1,5 TMC.

Para cada nível de concentração foram preparadas, pelo menos, seis réplicas independentes, sendo esse procedimento realizado três vezes, para cada nível de concentração, sendo as medições realizadas no menor intervalo de tempo possível. Assim, foram medidas dezoito replicatas para cada nível de concentração. Cada replicata foi medida três vezes e utilizada a média das três medidas. Além disso, para cada nível de concentração, foram calculados as concentrações médias, o desvio padrão e o coeficiente de variação (CV) da repetitividade.

5.6.2.3 Critérios de Aceitação da Precisão

O CV é usado para verificar as condições de aceitação da repetitividade, sendo que o CV calculado deve ser menor que o CV tabelado. Na Tabela 7 são citados os valores de CV tabelados para os diferentes intervalos. Para comparação, é recomendado usar 2/3 do valor tabelado.

Tabela 7: Critérios de aceitabilidade para a reprodutividade.

Concentração (C)	Coefficiente de Variação (CV) (%)
$C < 1 \mu\text{g/kg}$	35
$1 \mu\text{g/kg} \leq C < 10 \mu\text{g/kg}$	30
$10 \mu\text{g/kg} \leq C < 100 \mu\text{g/kg}$	20
$100 \mu\text{g/kg} \leq C < 1 \text{mg/kg}$	15
$1 \text{mg/kg} \leq C < 10 \text{mg/kg}$	10
$10 \text{mg/kg} \leq C < 100 \text{mg/kg}$	7,3

Fonte: Manual de garantia da qualidade do MAPA, 2011

O coeficiente de variação é calculado segundo a equação (4).

$$CV = (\text{desvio padrão}/\text{média}) \times 100 \quad (4)$$

5.6.3 Estudo da Seletividade Mediante o Efeito da Matriz

A seletividade informa o quanto um método analítico permite determinar um analito sem a interferência de outros componentes da matriz (MANUAL DE GARANTIA DA QUALIDADE ANALÍTICA. MAPA, 2011). A verificação da seletividade do método deve ser realizada a partir da comparação entre os sinais (resposta instrumental) advindos do processamento da matriz, do digerido da matriz fortificada e do analito em solvente puro (Manual de Garantia da Qualidade Analítica. MAPA, 2011).

O estudo do efeito de matriz objetiva averiguar possíveis interferências causadas pelas diversas substâncias que compõem a matriz amostral, gerando, basicamente fenômenos de diminuição ou ampliação do sinal instrumental ou resposta instrumental (Manual de Garantia da Qualidade Analítica. MAPA, 2011).

5.6.3.1 Procedimento de Determinação do Efeito de Matriz

Para avaliar o efeito de matriz foi preparado um conjunto de amostras, que foram fortificados com o analito, ou não, antes das mesmas serem digeridas. Da mesma forma, foram preparadas replicatas do solvente puro. No caso da adição do analito, esta foi feita em diferentes níveis de concentração: 0,2 ou 0,4 TMC; 1,0 TMC e 1,5 TMC. Para cada nível de concentração foram preparadas seis replicatas e cada replicata foi medida três vezes.

5.6.3.2 Critérios de Aceitação

Inicialmente foi aplicado o teste F (Fischer-Snedecor), de homogeneidade de variâncias, para verificar se as variâncias para o sinal do analito na presença da matriz (amostra matrizada) e no solvente puro (amostra não matrizada) eram estatisticamente iguais para cada nível de fortificação. Para comparar o valor de F obtido com o valor de F tabelado utilizou-se um nível de confiança de 95% (Manual de Garantia da Qualidade Analítica. MAPA, 2011).

O F é calculado pela equação (5) :

$$F = S1^2/S2^2 \quad (5)$$

Onde, $S1^2$ e $S2^2$ são, respectivamente, as variâncias das sextuplicatas para o analito em solvente puro e em presença da matriz da amostra, para cada nível de concentração, com a maior variância no numerador (Manual de Garantia da Qualidade Analítica. MAPA, 2011).

Se em um dado nível de concentração o valor F for menor que o F_{crit} , as variâncias para esse nível de concentração podem ser considerados iguais, ou seja, a matriz não tem efeito importante sobre a precisão do método nesse nível de fortificação considerado. Nesse caso, os desvios-padrão podem ser agrupados e a igualdade das médias dos dois conjuntos de amostras pode ser testada mediante o teste t de *student*, comparando-se as concentrações médias (Manual de Garantia da Qualidade Analítica. MAPA, 2011). O valor de t calculado é obtido pelas equações 5 e 6.

$$t_{calc,i} = \frac{|\bar{x}_{i,1} - \bar{x}_{i,2}|}{\sqrt{S^2 \left(\frac{1}{n_{i,1}} + \frac{1}{n_{i,2}} \right)}} \quad (5)$$

Onde:

$$S^2 = \frac{(n_{i,1} - 1)S_{i,1}^2 + (n_{i,2} - 1)S_{i,2}^2}{(n_{i,1} + n_{i,2} - 2)} \quad (6)$$

Sendo:

- $\bar{x}_{i,1}$ e $\bar{x}_{i,2}$ são as médias das concentrações do analito na presença (amostra matrizada) e ausência da matriz (solvente puro), respectivamente;
- $S_{i,1}$ e $S_{i,2}$ os desvios padrões das concentrações do analito no i -ésimo nível de fortificação;
- $n_{i,1}$ e $n_{i,2}$ são os números de replicatas das amostras 1 e 2 (não matrizadas e matrizadas).

Se F calculado for maior que F_{crit} , as variâncias não podem ser consideradas estatisticamente iguais para o nível de fortificação considerado. Verifica-se, então, o efeito da matriz mediante as equações (7) e (8), que são alternativas para o cálculo de t (Manual de Garantia da Qualidade Analítica. MAPA, 2011).

Equação para cálculo de t de student:

$$t_{calc,i} = \frac{|\bar{x}_{i,1} - \bar{x}_{i,2}|}{\sqrt{\frac{S_{i,1}^2}{n_{i,1}} + \frac{S_{i,2}^2}{n_{i,2}}}} \quad (7)$$

Equação para cálculo dos graus de liberdade:

$$v_i = \frac{\left(\frac{s_{i,1}^2}{n_{i,1}} + \frac{s_{i,2}^2}{n_{i,2}} \right)^2}{\frac{\left(\frac{s_{i,1}^2}{n_{i,1}} \right)^2}{n_{i,1} + 1} + \frac{\left(\frac{s_{i,2}^2}{n_{i,2}} \right)^2}{n_{i,2} + 1}} - 2 \quad (8)$$

O valor de t_{crit} é tabelado e esse é determinado pelo número de graus de liberdade (v_i) conforme a equação (8), ao nível de confiança de 95%.

Quando t calculado for menor que t_{crit} , podemos concluir que a matriz não afeta o sinal do analito no nível de concentração avaliado, mas se t for maior que t_{crit} podemos concluir que a matriz tem um efeito estatisticamente significativo sobre o resultado (MANUAL DE GARANTIA DA QUALIDADE ANALÍTICA. MAPA, 2011).

Para aceitação da não existência de efeito de matriz, não deve haver efeito para nenhum nível de concentração avaliado (MANUAL DE GARANTIA DA QUALIDADE ANALÍTICA. MAPA, 2011).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 RECUPERAÇÃO

O teste de recuperação foi realizado segundo os métodos oficiais do LANAGRO/RS. Na Tabela 8 são citados os valores obtidos experimentalmente. Comparando-se os valores de recuperação com o critério de aceitabilidade, podemos concluir que para todos os níveis de concentração o valor da recuperação está no intervalo de aceitação, portanto, mesmo alterando a matriz, são obtidos resultados exatos.

Tabela 8: Recuperação do analito adicionado à matriz de fígado de ave.

Elemento	Nível de Concentração (TMC)	Recuperado ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Valor Esperado ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recuperação (%)	Faixa de Aceitação
Cd	0,4	186,3	191,1	97,4	80-110%
	1,0	474,2	483,7	98,1	
	1,5	631,8	696,6	90,6	
Pb	0,4	164,6	192,4	85,6	
	1,0	453,9	484,7	93,6	
	1,5	653,3	693,6	94,2	
As	0,2	168,3	193,2	87,1	
	1,0	824,8	974,3	84,7	
	1,5	1341,6	1459,1	91,9	

6.2 REPETITIVIDADE

O teste de repetitividade foi realizado observando-se os critérios recomendados, ou seja, realizado pelo mesmo analista, no mesmo equipamento, no mesmo laboratório e no menor tempo possível para a realização das leituras.

Assim como o teste de recuperação, o teste de repetitividade foi realizado através de fortificação da matriz com padrões de calibração. Os níveis de fortificação foram 0,2 ou 0,4 TMC; 1,0 TMC e 1,5 TMC. Essas fortificações foram feitas em replicatas de seis amostras, sendo que cada uma foi medida três vezes. Esse procedimento foi realizado em três etapas, totalizando 18 replicatas para cada nível de concentração, totalizando 56 replicatas para cada elemento.

Podemos verificar na Tabela 9 que para todos os níveis de concentração, os valores de CV calculado foram menores que os valores de CV tabelado. Com isso, podemos concluir que a dispersão dos resultados está dentro dos limites de aceitabilidade e, desse modo, a nova matriz não afeta a precisão do método.

Tabela 9: Valores do desvio-padrão, CV calculado e CV tabelado.

Elemento	Nível de Concentração (TMC)	Desvio Padrão	Média ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	CV Calculado	CV Tabelado
As	0,2	11,4	171,5	6,67	10
	1,0	48,4	878,4	5,51	6,7
	1,5	63,2	1354,2	4,67	6,7
Cd	0,4	13,6	179,0	7,61	10
	1,0	27,0	433,7	6,25	10
	1,5	48,8	682,3	7,16	10
Pb	0,4	9,77	172,3	5,56	10
	1,0	37,0	420,4	8,79	10
	1,5	61,65	692,5	8,90	10

6.3 EFEITO DE MATRIZ

Para avaliar o efeito de matriz, a “matriz branca” (amostra matrizada) e o solvente puro (amostra não matrizada) foram novamente fortificados em três níveis diferentes de concentração. Foram preparadas 6 replicatas para cada nível de concentração e o analito em cada uma delas foi medido três vezes.

Inicialmente foi aplicado o teste F aos dados experimentais, cujos resultados são apresentados na Tabela 10. Para o teste F considerou-se 5 graus de liberdade (número de replicatas da amostra - 1), com um nível de confiança de 95% (MILLER, C.N.; MILLER, J.N., 1988). Segundo a Tabela 10, todos os valores de F calculado foram menores que o valor tabelado, podendo-se afirmar que as variâncias, para os diferentes níveis de concentração, podem ser consideradas iguais. A partir dessa informação, foi possível aplicar o teste *t* de *student*, onde o valor de *t* foi calculado mediante a equação (5).

Neste caso, o número de graus de liberdade foi 10 ((número de replicatas para solução matrizada + número de replicatas para solução não matrizada) - 2) e o nível de significância foi 95% (MILLER, C.N.; MILLER, J.N., 1988). Os valores de *t* calculado são citados na Tabela 11. Podemos verificar que para todos os elementos e para todos os níveis

de concentração, os valores de t calculado foram menores que o valor de t crítico, ou seja, podemos concluir que a matriz não afeta o sinal do analito.

Tabela 10: Desvio padrão quadrático (S^2) dos resultados encontrados para os diferentes níveis de concentração em relação ao TMC.

Elemento	Nível de Concentração	S^2 , Amostra Matrizada	S^2 , Amostra não Matrizada	F calculado	F tabelado
Arsênio	0,2	29,2	6,9	4,19	
	1,0	1046,4	240,0	4,36	
	1,5	5098,3	2805,6	1,86	
Cádmio	0,4	103,9	22,9	4,54	
	1,0	568,3	119,7	4,75	5,05
	1,5	1863,1	520,9	3,58	
Chumbo	0,4	189,0	61,3	3,09	
	1,0	631,9	489,1	1,29	
	1,5	548,3	346,4	1,58	

Tabela 11: Comparação dos valores de t para os diferentes níveis de concentração.

Elemento	Nível de Concentração (TMC)	t calculado	t crítico
Arsênio	0,2	0,01	
	1,0	0,64	
	1,5	0,32	
Cádmio	0,4	0,43	
	1,0	0,05	2,23
	1,5	0,98	
Chumbo	0,4	0,15	
	1,0	0,18	
	1,5	0,01	

6.4 SUSPENSÃO

O preparo da amostra através da formação de suspensão foi proposto como método alternativo ao método oficial de digestão utilizado pelo MAPA. O método proposto possui aspectos favoráveis, tais como redução do tempo de preparo da amostra, economia de reagentes, materiais e mão-de-obra e, principalmente, porque poderia permitir a determinação dos três elementos (Cd, Pb e As) na mesma alíquota preparada da amostra.

Para avaliar o método proposto, foi feita análise do material de referência certificado, sendo os três elementos determinados por GF AAS, cujos resultados obtidos são mostrados na Tabela 12, onde foram observados resultados satisfatórios para Cd e Pb, mas não para o As. Isso ocorreu provavelmente por causa do efeito da matriz (ATZ, V.L., 2008).

Além da análise do material de referência certificado, foi ainda feito teste de recuperação do analito, utilizando-se padrão aquoso certificado. Foram novamente obtidos bons resultados somente para Pb e Cd, conforme pode ser visto na Tabela 13.

Foi feita também análise do padrão de As, para verificar possíveis problemas de instrumentação ou concentração dos reagentes. A concentração certificada de arsênio é $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ e a encontrada foi $51,9 \mu\text{g kg}^{-1}$, evidenciando que os resultados incorretos são decorrentes dos efeitos da matriz fígado de ave, na determinação do As por GF AAS.

Tabela 12: Resultado da análise de material de referência certificado (fígado bovino).

Elemento	Certificado ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Valor Médio Encontrado ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recuperação (%)
Cádmio	$97,0 \pm 1,4$	92,97	89,5	92,3
		88,02		
		87,60		
Chumbo	$62,8 \pm 1,0$	73,78	67,7	108
		61,79		
		67,65		
Arsênio	$19,6 \pm 1,4$	10,93	9,5	48,4
		9,80		
		7,75		

Tabela 13: Recuperação do analito adicionado à matriz de fígado de ave.

Elemento	Valor Esperado ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Valor Médio encontrado ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recuperação (%)
Cádmio	238,1	235,2	237,4	99,7
		230,0		
		247,1		
Chumbo	238,1	254,6	251,4	106
		253,6		
		245,9		
Arsênio	476,1	187,9	183,0	38,4
		182,4		
		178,7		

6.5 DIGESTÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS

A digestão das amostras em forno micro-ondas também foi avaliada como método alternativo ao método oficial do MAPA. O novo método de digestão foi avaliado visando-se a determinação por GF AAS dos três elementos (As, Cd e Pb) em uma única alíquota preparada da amostra e também por ser mais rápido e mais facilmente executável, trazendo diversos benefícios financeiros ao longo do tempo, além da menor geração de resíduos.

A determinação de arsênio por HG AAS foi também testada, para a amostra digerida em forno micro-ondas, mas sem sucesso devido à formação de precipitado quando da adição da solução de iodeto de potássio e ácido ascórbico.

Da mesma forma que foi feito para a suspensão, foi analisado material de referência e feitos testes de recuperação do analito (com padrão certificado). Novamente, foram obtidos bons resultados para Cd e Pb, conforme pode ser observado nas Tabelas 14 e 15. Observa-se que o As não foi detectado no fígado bovino certificado, que foi digerido.

Com base nos resultados encontrados, a preparação da amostra (fígado bovino) na forma de suspensão e a digestão assistida por micro-ondas poderiam ser empregadas para a determinação de Cd e Pb. Com respeito ao As, um estudo mais detalhado faz-se necessário quanto ao programa de temperatura e tempo, utilizando-se também outros modificadores químicos ou até mesmo maiores quantidades desses.

Tabela 14: Recuperação do analito adicionado à matriz de fígado de ave.

Elemento	Valor Esperado ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Média do Valor Encontrado ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recuperação (%)
Cádmio	260,4	266,6	267,3	103
		267,5		
		267,8		
Chumbo	271,7	248,9	249,3	91,9
		249,5		
		249,5		
Arsênio	520,8	194,4	218,8	42,0
		228,1		
		233,9		

Tabela 15: Resultado da análise de material de referência certificado (fígado bovino).

Elemento	Certificado ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Valor Médio Encontrado ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recuperação, (%)
Cádmio	$97,0 \pm 1,4$	81,74	82,9	85,4
		83,02		
		83,88		
Chumbo	$62,8 \pm 1,0$	54,68	63,06	100
		69,67		
		64,83		
Arsênio	$19,6 \pm 1,4$	$< 1,0^a$	-	-
		$< 1,0$		
		$< 1,0$		

a: LD, em $\mu\text{g kg}^{-1}$

6.6 ESTUDO DO PROGRAMA DO FORNO DE GRAFITE

Foram preparadas curvas de temperatura de pirólise e de atomização para As, Cd e Pb na matriz (fígado ave), a fim de se avaliar se o programa de temperatura e tempo (para músculo e rim, conforme o método oficial) do forno de grafite era adequado para a matriz fígado. As curvas de temperatura de pirólise e atomização são mostradas nas Figuras 1-3.

Figura 1: Curvas de temperatura de pirólise e atomização para Cd.

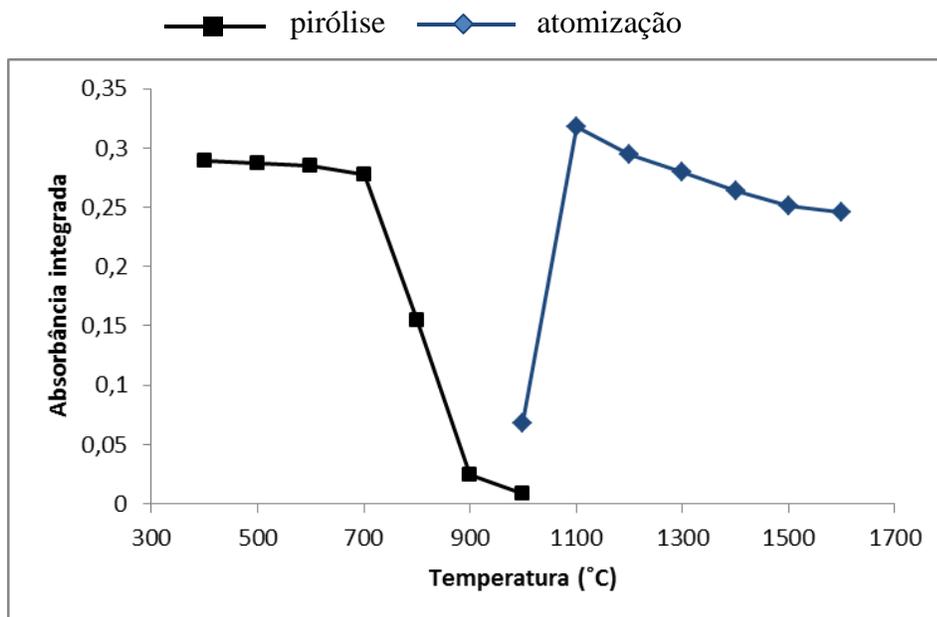


Figura 2: Curvas de temperatura de pirólise e atomização para Pb.

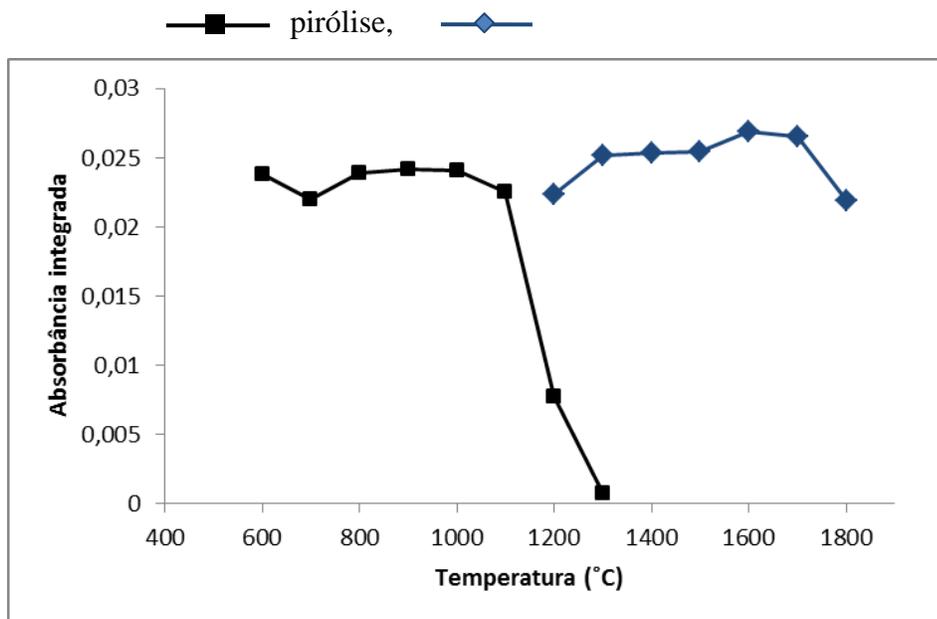
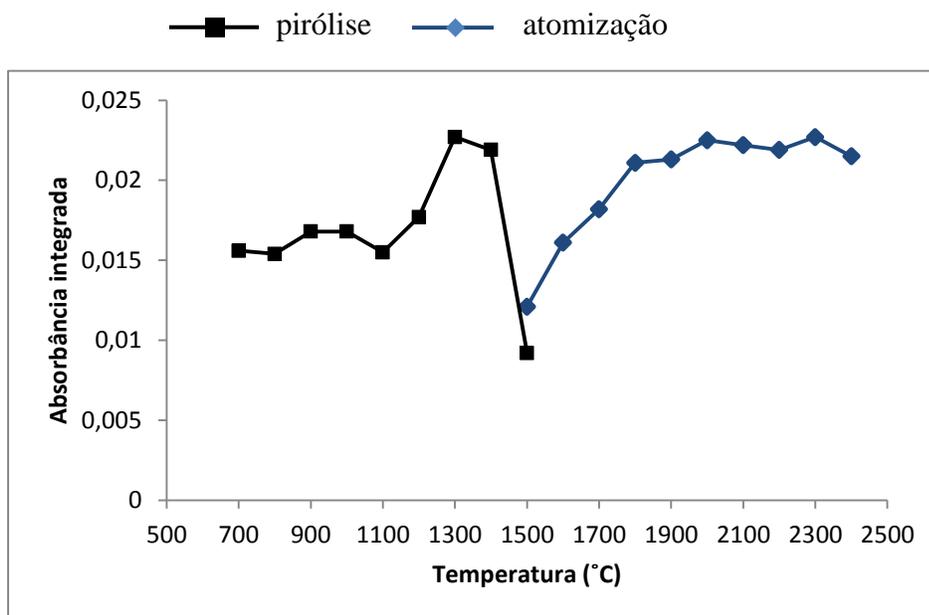


Figura 3: Curvas de temperatura de pirólise e atomização para As.



Nas Figuras 1, 2 e 3 verifica-se um comportamento estável da absorbância do Cd até 700 °C e do Pb até 1100 °C, diminuindo em temperaturas mais altas. Comparando-se essas temperaturas com as utilizadas (Tabela 1), podemos constatar que a temperatura do Cd é adequada, enquanto que a do Pb poderia ser 100 °C maior, aumentando a sensibilidade. Para o As, a temperatura de pirólise mais adequada seria entre 1300 °C e 1400 °C, em vista da melhor sensibilidade e, possivelmente, maior eliminação da matriz. Com uma temperatura de pirólise mais alta, ou com duas etapas de pirólise, a recuperação do As poderia ser melhor (veja as Tabelas 12-14). Quanto à temperatura de atomização, aquelas utilizadas para As e Pb são adequadas. No entanto, deveria ser 1100 °C para Cd, pois o sinal começa a diminuir em temperaturas mais altas. A temperatura utilizada foi 1500 °C (Tabela 1, conforme o método oficial), que está bem acima. Isso deve ser a principal razão da recuperação mais baixa observada para o Cd em alguns casos (Tabelas 12 e 15).

7. AVALIAÇÃO DE CUSTOS

Foram feitas três avaliações do custo relacionado com a metodologia proposta neste trabalho, em relação ao método oficial, ou seja, a utilização de uma única matriz ao invés de duas, além da utilização de um único método de preparo da amostra.

7.1 AVALIAÇÃO DA METODOLOGIA OFICIAL

O método oficial do LANAGRO/RS é confiável, pois foi validado pelo INMETRO (Instituto Nacional de Pesos e Medidas), de acordo com ISO 17025 (Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2005), onde foi aprovado em todos os testes que a validação exige. Porém, é um método demorado e leva à geração de muitos resíduos. A geração de resíduos é uma preocupação atual a nível mundial, principalmente com relação a elementos tóxicos, como é o caso do As, Cd e Pb. Nesse contexto, em todos os trabalhos realizados há uma preocupação com relação à diminuição dos resíduos.

A metodologia proposta proporcionaria uma vantagem em relação ao tempo de análise que, além do menor custo, possibilitaria um maior número de análises anuais, aumentando o poder de fiscalização dos contaminantes inorgânicos em questão, em âmbito nacional.

7.2 COMPARAÇÃO DOS CUSTOS

Para avaliar os custos da metodologia proposta foram calculados os gastos necessários para analisar 10 amostras.

Os custos envolvidos com os reagentes e gases utilizados estão resumidos nas Tabelas 16, 17 e 18 (<http://www.comprasnet.gov.br>, <http://www.quimibras.com.br>. Acesso em 26/11/2013). Considerando-se uma curva de calibração com seis pontos para Cd e As e cinco pontos para Pb, o custo total dos reagentes e gases para a determinação dos três elementos nas 10 amostras, segundo o método oficial do LANAGRO, seria R\$ 20,70. O custo total da análise é menor quando é feita a análise somente do fígado, pois se utiliza uma única matriz, ao invés de duas, para as mesmas técnicas empregadas, pois há menor custo com relação à coleta, transporte, armazenamento e mão-de-obra qualificada.

Considerando-se as curvas de calibração do Cd, Pb e As, o custo total dos reagentes e gases seria menor se fosse feita digestão da amostra em forno de micro-ondas (R\$ 2,70) ou se a amostra fosse preparada na forma de suspensão (R\$ 4,80), sendo os três elementos determinados por GF AAS.

Tabela 16: Reagentes e gases utilizados para a execução do método oficial e respectivos custos.

Reagente	Quantidade	Custo (R\$)
Ácido nítrico	1 L	31,70
Peróxido de hidrogênio	1 L	54,04
Nitrato de magnésio (hexahidratado)	0,5 kg	142,24
Ácido clorídrico	1 L	19,80
Iodeto de potássio	0,5 kg	217,92
Ácido ascórbico	1 kg	160,68
Hidróxido de sódio	1 kg	44,00
Solução padrão de arsênio	0,1 L	110,27
Solução padrão de cádmio	0,1 L	134,86
Solução padrão de chumbo	0,1 L	128,33
Gás de argônio	1 m ³	49,86
Gás de nitrogênio	1 m ³	83,12
Tetrahidroborato de sódio	0,5 kg	330,00
Nitrato de Pd (modificador)	0,1 L	207,50
Nitrato de Mg (modificador)	0,1 L	170,20

Tabela 17: Custos dos reagentes e gases utilizados para a execução do método em que a amostra é analisada na forma de suspensão com hidróxido de tetrametilamônio (TMAH).

Reagente	Quantidade	Custo (R\$)
TMAH	1 L	390,00
Gás de argônio	1 m ³	49,86
Solução padrão de arsênio	0,1 L	110,27
Solução padrão de cádmio	0,1 L	134,86
Solução padrão de chumbo	0,1 L	128,33
Nitrato de Pd (modificador)	0,1 L	207,50
Nitrato de Mg (modificador)	0,1 L	170,20

Tabela 18: Custos dos reagentes e gases utilizados para a execução do método em que a amostra é digerida em forno de micro-ondas.

Reagente	Quantidade	Custo (R\$)
Ácido nítrico	1 L	31,70
Gás de argônio	1 m ³	49,86
Peróxido de hidrogênio	1 L	54,04
Solução padrão de arsênio	0,1 L	110,27
Solução padrão de cádmio	0,1 L	134,86
Solução padrão de chumbo	0,1 L	128,33
Nitrato de Pd (modificador)	0,1 L	207,50
Nitrato de Mg (modificador)	0,1 L	170,20

Outra questão que deve ser levada em consideração é o volume de resíduo gerado. Fazendo-se um levantamento, verificou-se que para a análise dessas mesmas 10 amostras são gerados em torno de 1000 mL de resíduos líquidos, seguindo-se o método oficial de análise. Se for analisada somente uma matriz, conforme proposto, esse volume seria reduzido para 170 mL, se a amostra fosse digerida em forno de micro-ondas. Este volume seria ainda menor, 40 mL, se a amostra fosse preparada na forma de suspensão com TMAH.

Comparando-se as Tabelas 17, 18 e 19, verificamos que a metodologia de menor custo seria aquela em que a amostra é digerida em forno de micro-ondas, seguida da metodologia em que a amostra é preparada na a forma de suspensão e, por último, a metodologia oficial. Quanto ao consumo de reagentes e gases, a digestão em forno de micro-ondas tem menor custo do que a preparação da suspensão, mas o método que usa suspensão é o de menor custo, pois é mais rápido, não necessita de equipamentos sofisticados, como um forno de micro-ondas, além de gerar a mínima quantidade de resíduo.

8. CONCLUSÃO

A determinação de Cd, Pb e As na matriz de fígado por GF AAS e HG AAS pode ser considerada adequada, pois conforme teste realizados foi possível demonstrar que a precisão, exatidão e seletividade do método já validado e utilizado para análise de rim e músculo não são alteradas

A digestão das amostras em forno de micro-ondas ou preparação de suspensão com TMAH podem ser utilizadas para a determinação de Cd e Pb por GF AAS. No entanto, para o As, estudos adicionais são necessários. As principais vantagens desses dois métodos são a maior rapidez da análise, o menor custo e a menor geração de resíduos. Embora a aquisição de um forno de micro-ondas para laboratório demande apreciáveis custos, a metodologia levaria à significativa redução dos custos em médio prazo.

Através da avaliação das temperaturas de pirólise e atomização recomendadas pelo método oficial, constatou-se que para a determinação de Cd no fígado de ave a temperatura de atomização deve ser mais baixa (1100 °C ao invés de 1500 °C), enquanto que a temperatura de pirólise para Pb deve ser mais alta (1100 °C ao invés de 1000 °C), e também constatou-se que a temperatura de pirólise para o As deve ser mais alta (1300 °C a 1400 °C ao invés de 1200 °C).

Através do estudo de custo foi possível verificar a enorme vantagem de adesão à nova metodologia, pois de imediato não há a necessidade de aquisição de novos materiais e equipamentos.

9. PERSPECTIVAS

Como perspectivas de continuidade do trabalho estão os estudos envolvendo a determinação de As por GF AAS, assim como a possibilidade de introduzir os métodos de preparo de amostra sugeridos. Com a verificação da possibilidade de alteração da matriz (análise de fígado ao invés de rim e músculo, de aves), tem-se a perspectiva dos resultados serem apresentados para os outros laboratórios da rede LANAGRO, cabendo aos mesmos, a inserção da nova matriz.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABEF, <http://www.abef.com.br/>, acessado no dia 03 de agosto de 2013.

ALBANO, F. M.; RAYA-RODRIGUES, M. T. **Validação e garantia da qualidade de ensaios laboratoriais**. Guia Prático. Rede Metrológica RS, Porto Alegre, p. 136, 2009.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, **NBR ISO/IEC 17025**: Registros gerais de competências de laboratório de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2005.

ATZ, V.L. **Desenvolvimento de métodos para determinação de elementos traços em sombra para área dos olhos e batom**. 2008. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2008.

Avicultura industrial, <http://www.aviculturaindustrial.com.br/>, acessado no dia 23 de novembro de 2013.

BARRA, C.M.; SANTELLI, R.E.; GUARDIA, M. 2000. **Especiação de Arsênio**. Química Nova, 2000. vol. 23, p. 61.

Comprasnet, <http://www.comprasnet.gov.br/>, acessado no dia 26 de novembro de 2013.

DAMIN, I.C.F. **Investigação da amostragem direta para determinação de elementos traços em carne *in natura* e em petróleo usando espectrometria de absorção atômica com forno de grafite**. 2009. Dissertação (mestrado em química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

DEDINA, J.; TSALEV, D. L. **“Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry”**, John Wiley & Sons, Chichester, p. 526, 1995.

ESFA (European Food Safety Authority). **Scientific Opinion on Arsenic in Food. Panel of Contaminants in the Food Chain**: The ESFA Journal, vol 1351, p. 198, 2009.
espectrometria atômica. Química Nova, 2002, vol. 25, p. 1132.

EURACHEM. **The fitness for purpose of analytical methods**. EURACHEM *guide*, Reino Unido, 1998.

FDR, <http://www.fdr.com.br/>, acessado no dia 23 de novembro de 2013.

FRUMKIN, H.; THUN, M. J. **Arsenic**: Cancer Journal of Clinical, vol. 51, p. 254-262, 2001.

GONZÁLES, A. G.; HERRADOR, M. A. **A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles**: Trends in Analytical Chemistry, 2007. vol. 26, p. 227-238.

HATHAWAY, G. J.; PROCTOR, N. H.; HUGHES, J. P.; **Arsenic and Arsine: Toxicology and Applied Pharmacology**, vol. 208, n. 2, p. 186-187, 2005.

HENDERSON, J. A.; BLOOD, D. C.; RADOSTITS, O. M., *Clínica Veterinária*, 5 ed, Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, p. 931-933, 1983.

LIMA, V.S. **Confiabilidade analítica e garantia da qualidade da análise de níquel em tecido vegetal**. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2011.

Manual de Garantia da Qualidade Analítica, Resíduos e Contaminantes em Alimentos, 2011, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

MCSHEEHY, S.; SZPUNAR, J.; MORABITO, R. **The Speciation of arsenic in biological tissues and the certification of reference materials of quality control**: Trends in Analytical Chemistry, vol. 22, p. 191-209, 2003.

MILLER, C.N.; MILLER, J.N. **Estatística para Química Analítica**. 2 ed. 1988, p 199.

MORRETO, A.L. **Determinação de Arsênio por espectrometria de absorção atômica por geração de hidreto em um sistema de injeção de fluxo**. 2001. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Campinas. 2001.

Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes - Animal, 2013, publicado na Instrução Normativa Nº 17, 29 de maio de 2013, Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

POLETTI, J. **Quantificação de elementos-traço em arroz. Trabalho de conclusão de curso em Bacharel em Química**. 2012. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2012.

Quimibrás, <http://www.quimibras.com.br/>, acessado no dia 26 de novembro de 2013.

RIDDLE, C.; **Analysis of geological materials**. Marcel Dekker, New York. p. 463, 1993.

SILVA, Jr, A.I.; BIDART, A.M.F.; CASELLA, R.J. **Absorção atômica**. p. 9, 2011.

SMEDLEY, P. L.; KINNINGURG, D. G. **A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters**: Environmental geochemistry of potentially toxic metals. Berlin: Springer-Verlag, vol. 17, p. 517-568, 2002.

TAJKARIMI, M.; FAGHIH, M. A.; POURSOLTANI, H. **Lead residue levels in raw milk from different regions of Iran**: Food Control, vol. 9, p. 4706-4707, 2008.

TAKASE, I.; PEREIRA, H.B.; LUNA, A.S. **A geração química de vapor em espectrometria atômica**. Química. Nova, Nov./Dec. 2002, vol. 25, no.6b, p. 1132.

WHITE, L. D.; CORY-SLECHTA, D. A.; GILBERT, M. E. **New and evolving concepts in the neurotoxicology of lead:** Toxicology and applied pharmacology, vol. 225, p. 1-27, 2007.