



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**



**ADILSON DE SANTANA SANTOS**

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM MATERIAL DE  
REFERÊNCIA DE LABORATÓRIO A PARTIR DO LEITE EM PÓ:  
REQUISITO DE QUALIDADE PARA ANÁLISE INORGÂNICA.**

Salvador - BA  
Dezembro/2020

**ADILSON DE SANTANA SANTOS**

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM MATERIAL DE  
REFERÊNCIA DE LABORATÓRIO A PARTIR DO LEITE EM PÓ:  
REQUISITO DE QUALIDADE PARA ANÁLISE INORGÂNICA.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Química, área de concentração Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luís Costa Ferreira

Salvador - BA

Dezembro/2020

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Ciências e Tecnologias Prof. Omar Catunda, SIBI - UFBA.

S237 Santos, Adilson de Santana

Produção e caracterização de um material de referência de laboratório a partir do leite em pó: requisito de qualidade para análise inorgânica / Adilson de Santana Santos. – Salvador, 2020.

124 f.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luis Costa Ferreira

Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Química, 2020.

1. Química Analítica. 2. Análise Inorgânica. 3. PCA. 4. HCA. I. Ferreira, Sérgio Luis Costa. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

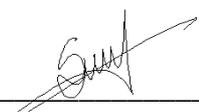
CDU 543

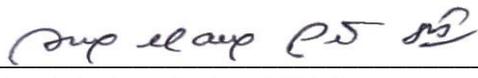
## TERMO DE APROVAÇÃO

ADILSON DE SANTANA SANTOS

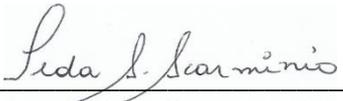
"PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM MATERIAL DE REFERÊNCIA DE LABORATÓRIO DE LEITE EM PÓ - REQUISITO DE QUALIDADE PARA ANÁLISE INORGÂNICA"

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor(a) em Química, Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Sergio Luis Costa Ferreira   
Doutorado em Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio)  
Universidade Federal da Bahia

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Pinto dos Santos   
Doutorado em Química, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)  
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Marcos de Almeida Bezerra   
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)  
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ieda Spacino Scarminio   
Doutorado em Química, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp)  
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Antônio Fernando de Souza Queiroz   
Doutorado em Geologia Geoquímica do Meio Ambiente, Université Louis Pasteur de  
Strasbourg  
Universidade Federal da Bahia

Salvador, 04 de dezembro de 2020.

*Dedico este trabalho a minha família, amigos e todos os Professores que contribuíram para minha formação.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por mim possibilitar a realização dos meus projetos de vida, sempre me dando forças para enfrentar e vencer todas as adversidades. A Ele todos os agradecimentos também por colocar no meu caminho pessoas que tornaram essa trajetória menos difícil e, com certeza, inesquecível.

Ao professor Sérgio Luis Costa Ferreira que mesmo não me conhecendo aceitou não só esta orientação, mas também contribuir de forma incansável e inspiradora para a realização dos meus sonhos. Serei eternamente grato, Mestre!

À minha amada esposa Bruna, que sofreu junto comigo na minha ausência e sempre me encorajou na realização deste sonho. Agradeço a ela também pelo maior e melhor presente que poderia receber, o nosso príncipe Ben.

A toda minha família, principalmente meus pais, que sempre me guiaram pelos melhores caminhos e são os responsáveis diretos por esta conquista.

À Professora Liz Oliveira pela disponibilidade e valiosas contribuições que deu ao trabalho sempre que necessitei. Tenha certeza de que você terá um belo caminho para trilhar com sua simplicidade e competência.

À professora Heloysa Martins, por permitir a parceria com o nosso laboratório e, dessa forma, possibilitar a realização das análises no ICP OES.

À Kelly Rodrigues, do Labcat, pela parceria, disponibilidade e amizade construídas durante a realização das análises no Cienam.

À Caio, Darllen e Valdinei, que me acolheram em sua moradia no período inicial e possibilitaram também a construção da amizade que levarei para a vida.

A todos os amigos e colegas do GRPQQ (não citarei nomes para não esquecer alguém), pelos momentos não só de troca de conhecimento, mas também de descontração que tornou essa trajetória ainda mais inesquecível.

À Universidade Federal da Bahia, por disponibilizar a infraestrutura necessária para a realização deste trabalho e, conseqüentemente, viabilizar a conclusão do mesmo.

A todos os Professores do Programa de Pós-Graduação em Química da UFBA pelos valiosos conhecimentos transmitidos durante as disciplinas ministradas. Agradeço-os por fazerem parte da minha trajetória acadêmica.

Aos funcionários da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química da UFBA por toda atenção dada nos trâmites burocráticos.

A todos os funcionários do Instituto de Química da UFBA (limpeza, vigilantes e pessoal de apoio) que por diversas vezes atendem aos nossos pedidos de ajuda.

Aos laboratórios participantes do estudo interlaboratorial pela disponibilidade e envio dos resultados que permitiram a conclusão deste ciclo.

A Fernando Mota, da empresa LabWin, pela elaboração das elipses de confiança.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que torceram e contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigado!

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos  
não é senão uma gota de água no mar. Mas o  
mar seria menor se lhe faltasse uma gota”*

*(Madre Teresa de Calcutá)*

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Aspectos do sistema de controle e garantia de qualidade das medições .....	28
Figura 2 – Classificação do assunto de todos os 1056 artigos pesquisados referente à produção de Materiais de Referência .....	29
Figura 3 – Fluxograma das etapas de um processo de certificação de um MR* [84].....	37
Figura 4 – Estudo isócrono para (a) estabilidade a curto prazo e (b) estabilidade a longo prazo .....	42
Figura 5 – Representação gráfica do índice z-scores para avaliar o desempenho dos laboratórios participantes do estudo colaborativo .....	47
Figura 6 – Modelo representativo de uma elipse de confiança .....	49
Figura 7 – Indicação dos tipos de erros possíveis no gráfico da elipse de confiança .....	49
Figura 8 - Gráfico de escores (A) e pesos (B) para as duas primeiras componentes principais do estudo da influência da massa mínima .....	66
Figura 9 - Gráfico de escores PC2 <i>versus</i> PC1: (A) homogeneidade intra-frasco e (B) homogeneidade entre frascos .....	68
Figura 10 - Dendrograma para o estudo de homogeneidade entre frascos obtido através do algoritmo de Ward e a distância Euclidiana durante a preparação do MRL de leite em pó ....	70
Figura 11 - Gráfico da análise de regressão do estudo de estabilidade a longo prazo para cálcio durante a preparação do MRL de leite em pó.....	72
Figura 12 - Gráfico da análise de regressão do estudo de estabilidade a longo prazo para ferro durante a preparação do MRL de leite em pó .....	72
Figura 13 - Gráfico da análise de regressão do estudo de estabilidade a longo prazo para potássio durante a preparação do MRL de leite em pó .....	73
Figura 14 - Gráfico da análise de regressão do estudo de estabilidade a longo prazo para magnésio durante a preparação do MRL de leite em pó.....	73
Figura 15 - Gráfico da análise de regressão do estudo de estabilidade a longo prazo para sódio durante a preparação do MRL de leite em pó .....	73
Figura 16 - Gráfico da análise de regressão do estudo de estabilidade a longo prazo para fósforo durante a preparação do MRL de leite em pó.....	74
Figura 17 - Gráfico da análise de regressão do estudo de estabilidade a longo prazo para zinco durante a preparação do MRL de leite em pó .....	74

Figura 18 – Resultados do estudo de estabilidade durante a preparação do MRL de leite em pó: (A) Gráfico de escores de PC2 <i>versus</i> PC1 e (B) dendrograma obtido usando método de agrupamento de ligação completa e distância Euclidiana.....	76
Figura 19 – Gráfico z-scores obtido dos resultados dos laboratórios participantes do estudo colaborativo durante a preparação do MRL de leite em pó .....	81
Figura 20 - Gráfico de elipses para cálcio em leite em pó nos dois itens de ensaio .....	82
Figura 21 - Gráfico de elipses para ferro em leite em pó nos dois itens de ensaio .....	83
Figura 22 - Gráfico de elipses para potássio em leite em pó nos dois itens de ensaio.....	83
Figura 23 - Gráfico de elipses para magnésio em leite em pó nos dois itens de ensaio.....	84
Figura 24 - Gráfico de elipses para sódio em leite em pó nos dois itens de ensaio .....	84
Figura 25 - Gráfico de elipses para fósforo em leite em pó nos dois itens de ensaio .....	85
Figura 26 - Gráfico de elipses para zinco em leite em pó nos dois itens de ensaio .....	85
Figura 27 – Contribuição relativa de cada componente para a incerteza expandida dos elementos estudados.....	87
Figura 28 - Efeito das temperaturas de pirólise e atomização sobre a determinação simultânea de Cr e Fe em amostras de leite usando HR-CS GFAAS .....	95

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo de trabalhos publicados na última década para a determinação de elementos em leite em pó e seus derivados.....	31
Tabela 2 - Programa de aquecimento adotado para a digestão de amostra de leite em micro-ondas.....	58
Tabela 3 - Resultados da avaliação da exatidão obtido para um Material de Referência Certificado de tecido de peixe (Fish Tissue MA-B-3/TM).....	63
Tabela 4 - Resultados da avaliação da exatidão obtidos através de testes de adição/recuperação em três níveis de concentração.....	64
Tabela 5 - Resultados da ANOVA para o estudo da massa mínima do candidato a MRL de leite em pó.....	65
Tabela 6 - Resultados de ANOVA para os estudos de homogeneidade intra e entre frascos <sup>(a)</sup> .....	67
Tabela 7 - Parâmetros estatísticos obtidos através de ANOVA fator único e incerteza estimada devido à falta de homogeneidade entre frascos( $u_{bb}$ ) para a preparação do MRL de leite em pó.....	70
Tabela 8 - Parâmetros provenientes da ANOVA fator único para o estudo de estabilidade durante a preparação do MRL de leite em pó.....	71
Tabela 9 - Parâmetros de regressão linear associados com a estabilidade a longo prazo durante a preparação do MRL de leite em pó.....	75
Tabela 10 - Resultados do estudo de estabilidade obtido durante a preparação do MRL de leite em pó após um período de estocagem de 1 a 20 meses.....	77
Tabela 11 - Parâmetros estatísticos obtidos através de ANOVA fator único e incerteza estimada associada a estabilidade a longo prazo durante a preparação do MRL de leite em pó.....	78
Tabela 12 - Procedimentos usados pelos laboratórios durante a comparação interlaboratorial para obtenção do valor de referência <sup>a</sup> .....	80
Tabela 13 - Valores de propriedade e estimativa das incertezas padrão referente à caracterização ( $u_{char}$ ), homogeneidade entre frascos ( $u_{bb}$ ), estabilidade longo prazo ( $u_{lts}$ ) e incerteza combinada ( $U_{RM}$ ) para a fração em massa de cada elemento para o candidato a MRL de leite em pó.....	86
Tabela 14 - Programa de temperatura adotado para a determinação simultânea de Cr e Fe em soluções digeridas de leite por HR-CS GFAAS.....	92
Tabela 15 - Condições operacionais do ICP-MS para a determinação de Cr e Fe em amostras de leite em pó.....	93

Tabela 16 – Características analíticas do método proposto. ....	96
Tabela 17 - Determinação simultânea de Cr e Fe em amostras de leite usando HR-CS GFAAS e ICP-MS.....	97
Tabela 18 – Concentração dos elementos de interesse na amostra de leite em pó para o estudo da massa mínima, após decomposição ácida e quantificação por ICP OES (média ± desvio padrão, n = 3) .....	115
Tabela 19 - Concentração dos elementos de interesse na amostra de leite em pó para o estudo da homogeneidade intra-frasco, após decomposição ácida e quantificação por ICP OES (média ± desvio padrão, n = 10).....	116
Tabela 20 - Concentração dos elementos de interesse na amostra de leite em pó para o estudo da homogeneidade entre frascos, após decomposição ácida e quantificação por ICP OES (média ± desvio padrão, n = 3).....	116
Tabela 21 - Concentração dos elementos de interesse na amostra de leite em pó para o estudo de estabilidade, após decomposição ácida e quantificação por ICP OES (média ± desvio padrão, n = 3) .....	118
Tabela 22 - Laboratórios participantes do estudo interlaboratorial durante a preparação do MRL de leite em pó.....	121
Tabela 23 – Resultados fornecidos pelos laboratórios participantes do estudo interlaboratorial .....	122
Tabela 24 – Resultados excluídos após avaliação estatística através dos testes de Grubbs e Cochran .....	123

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANOVA	Análise de Variância, do inglês, <i>Analysis of Variance</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AQC	Controle de Qualidade Analítico, do inglês, <i>Analytical Quality Control</i>
BCR	Gabinete Comunitário de Referência, do inglês, <i>Community Bureau of Reference</i>
CE	Comissão Europeia
CETEM	Centro de Tecnologia Mineral
EDXRF	Fluorescência de raios X por dispersão em energia, do inglês, <i>energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry</i>
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAAS	Espectrometria de Absorção Atômica em Chama, do inglês, <i>Flame atomic absorption spectrometry</i>
GUM	Guia para expressão de incerteza na medição, do inglês, <i>Guide to the expression of uncertainty in measurement</i>
HCA	Análise de Agrupamento Hierárquico, do inglês, <i>Hierarchical Cluster Analysis</i>
HR-CS FAAS	Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua em chama, do inglês, <i>high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês, <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>
ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês, <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>
INAA	Instrumento de Análise por Ativação de Nêutrons, do inglês, <i>instrumental neutron activation analysis</i>
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade na Saúde
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
INPM	Instituto Nacional de Pesos e Medidas
IPEN	Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares

IPT	Instituto de Pesquisas Tecnológica do Estado de São Paulo
ISO	<i>International Organization for Standardization</i> (Organização Internacional para a Padronização)
JCR	Centro Comum de Pesquisa, do inglês, <i>Joint Research Centre</i>
LIBS	Espectroscopia de plasma gerado por laser, do inglês, <i>laser-induced breakdown spectroscopy</i>
LOD	<i>Limit of detection</i> (Limite de detecção)
LOQ	<i>Limit of quantification</i> (Limite de quantificação)
MCL	Material de Controle de Laboratório
MIP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas
MR	Material de Referência
MRC	Material de Referência Certificado
MRL	Material de Referência de Laboratório
NBS	Gabinete Nacional de Padrões, do inglês, <i>National Bureau of Standards</i>
NIST	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia, do inglês, <i>National Institute of Standards and Technology</i>
PC	Componente Principal, do inglês, <i>Principal Component</i>
PCA	Análise de Componentes Principais, do inglês, <i>Principal Component Analysis</i>
PIB	Produto Interno Bruto
U	Incerteza Expandida
$u_{bb}$	Incerteza Padrão da Homogeneidade
$u_{char}$	Incerteza Padrão da Caracterização
$u_{lts}$	Incerteza Padrão da Estabilidade a Longo Prazo
$U_{MR}$	Incerteza Expandida do Material de Referência
$U_{MRC}$	Incerteza Expandida do Material de Referência Certificado
$u_{sts}$	Incerteza Padrão da Estabilidade a Curto Prazo
VIM	Vocabulário Internacional de Metrologia

## RESUMO

O leite em pó e seus derivados são amplamente consumidos em todo o mundo, o que requer o desenvolvimento de Materiais de Referência para a avaliação da exatidão das metodologias analíticas que são empregadas para a análise dessas matrizes alimentícias. Nesse contexto, este estudo propõe o desenvolvimento de dois trabalhos: o primeiro consiste no preparo e caracterização de um Material de Referência de Laboratório (MRL) a partir do leite em pó para análise inorgânica e o segundo tem como objetivo a determinação simultânea de cromo e ferro em amostras desse alimento usando espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua em forno de grafite (HR-CS GF AAS). Para o desenvolvimento do MRL, as recomendações das ISO Guias 30-35 foram atendidas através das etapas de homogeneidade, estabilidade, caracterização e avaliação da incerteza. Através de parâmetros obtidos através da análise de variância (ANOVA) fator único foi possível afirmar que o material é homogêneo e estável em relação à Ca, Fe, K, Mg, Na, P e Zn. De forma alternativa à ANOVA, análise multivariada (PCA e HCA) também foi aplicada ao conjunto de dados e possibilitou a extração de uma maior quantidade de informações, como por exemplo, que Ca, K, Na e P, na PC1, e Fe e Mg, na PC2, são os maiores responsáveis pela dispersão dos resultados quando uma massa mínima de 100 mg foi estudada. O estudo de caracterização foi estabelecido através de um estudo interlaboratorial com a participação de 15 laboratórios, sendo um internacional. Os valores de propriedade, bem como a incerteza combinada ( $U_{RM}$ ) foram as seguintes ( $\text{mg g}^{-1}$ ): Ca ( $8,795 \pm 1,137$ ), Fe ( $0,107 \pm 0,017$ ), K ( $11,727 \pm 1,983$ ), Mg ( $0,841 \pm 0,125$ ), Na ( $3,654 \pm 0,672$ ), P ( $7,572 \pm 1,174$ ) e Zn ( $0,032 \pm 0,005$ ). Portanto, o novo material pode ser uma boa alternativa para avaliar procedimentos de rotina, controle de qualidade e validação de métodos analíticos relacionados com amostra de leite e derivados. Na determinação simultânea, a linha de ressonância primária escolhida para o Cr foi 357,869 nm (a maior sensibilidade para esse elemento) e a linha secundária (358,120 nm) para o Fe, que estão na mesma janela espectral do detector. Após as condições otimizadas, cinco amostras de leite foram analisadas e a concentração de cromo encontrada variou de 408 a 805  $\text{ng g}^{-1}$ . Entre as cinco amostras, três tiveram a concentração de ferro menor do que 19  $\mu\text{g g}^{-1}$  e nas outras duas a concentração variou de 151 a 191  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Dessa forma, o método proposto possui precisão, exatidão e sensibilidade necessárias para a determinação de cromo e ferro em amostras de leite.

**Palavras-chave:** materiais de referência, leite em pó, análise multivariada, determinação simultânea, HR-CS GF AAS.

## ABSTRACT

Powdered milk and its derivatives are widely consumed worldwide, which requires the development of Reference Materials to assess the accuracy of the analytical methodologies that are used to analyze these food matrices. In this context, this study proposes the development of two studies: the first consists of the preparation and characterization of a Laboratory Reference Material (LRM) from powdered milk for inorganic analysis and the second aims at the simultaneous determination of chromium and iron in samples of this food using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry (HR-CS GF AAS). For the development of the LRM, the recommendations of ISO Guides 30-35 were met through the steps of homogeneity, stability, characterization, and uncertainty assessment. Through parameters obtained through the one-way analysis of variance (ANOVA) it was possible to affirm that the material is homogeneous and stable concerning Ca, Fe, K, Mg, Na, P, and Zn. As an alternative to ANOVA, multivariate analysis (PCA and HCA) was also applied to the data set and made it possible to extract a greater amount of information, such as that for Ca, K, Na, and P, in PC1, and Fe and Mg, in PC2, are the most responsible for the dispersion of results when a minimum mass of 100 mg was studied. The characterization study was established through an interlaboratory comparison with the participation of 15 laboratories, one international. The property values, as well as the combined uncertainty ( $U_{RM}$ ) were as follows ( $\text{mg g}^{-1}$ ): Ca ( $8.795 \pm 1.137$ ), Fe ( $0.107 \pm 0.017$ ), K ( $11.727 \pm 1.983$ ), Mg ( $0.841 \pm 0.125$ ), Na ( $3.654 \pm 0.672$ ), P ( $7.572 \pm 1.174$ ), and Zn ( $0.032 \pm 0.005$ ). Therefore, the new material can be a good alternative to evaluate routine procedures, quality control, and validation of analytical methods related to samples of milk and dairy products. In the simultaneous determination, the primary resonance line chosen for Cr was 357.869 nm (the highest sensitivity for this element) and the secondary line (358.120 nm) for Fe, which are in the same spectral window of the detector. After the optimized conditions, five milk samples were analyzed and the chromium concentration found varied from 408 to 805  $\text{ng g}^{-1}$ . Among the five samples, three had an iron concentration lower than 19  $\mu\text{g g}^{-1}$  and in the other two, the concentration varied from 151 to 191  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Thus, the proposed method has precision, accuracy, and sensitivity for the determination of chromium and iron in milk samples.

# SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>19</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
1.1. <b>Material de Referência Certificado: importância e alternativa</b> .....	<b>21</b>
1.2. <b>A produção de Material de Referência no Brasil</b> .....	<b>23</b>
1.3. <b>Tendência atuais e desafios para o desenvolvimento de MRC</b> .....	<b>27</b>
1.4. <b>O leite em pó</b> .....	<b>30</b>
<b>2. CONSIDERAÇÕES SOBRE O PREPARO E A CARACTERIZAÇÃO</b> .....	<b>33</b>
2.1. <b>Guia para a produção de Material de Referência</b> .....	<b>33</b>
2.2. <b>Caracterização granulométrica</b> .....	<b>34</b>
2.3. <b>Processo de esterilização com raios gama</b> .....	<b>35</b>
2.4. <b>Caracterização de um Material de Referência</b> .....	<b>36</b>
2.5. <b>Estudo de homogeneidade</b> .....	<b>37</b>
2.6. <b>Estudo de estabilidade</b> .....	<b>40</b>
2.7. <b>Programa colaborativo para atribuição de valor de propriedade</b> .....	<b>44</b>
2.7.1.1. <b>Testes estatísticos para identificação e exclusão de valores anômalos</b> .....	<b>45</b>
2.7.1.2. <b>Modelagem através das Elipses de confiança</b> .....	<b>47</b>
2.8. <b>Avaliação da incerteza de um Material de Referência</b> .....	<b>49</b>
2.9. <b>A utilização da análise multivariada de dados</b> .....	<b>50</b>
2.9.1.1. <b>Análise de Componentes Principais - PCA</b> .....	<b>52</b>
2.9.1.2. <b>Análise de Agrupamento Hierárquico - HCA</b> .....	<b>54</b>
2.10. <b>Objetivos</b> .....	<b>56</b>
2.11. <b>Objetivo geral</b> .....	<b>56</b>
2.12. <b>Objetivos específicos</b> .....	<b>56</b>
2.13. <b>Procedimento experimental</b> .....	<b>56</b>
2.14. <b>Reagentes, soluções e amostras</b> .....	<b>56</b>
2.15. <b>Preparação do candidato a material de referência</b> .....	<b>57</b>
2.16. <b>Instrumentação</b> .....	<b>57</b>
2.17. <b>Procedimento para digestão das amostras de leite em pó</b> .....	<b>58</b>
2.18. <b>Características analíticas do método proposto</b> .....	<b>58</b>

2.19.	Estudo de homogeneidade.....	59
2.19.1.1.	Incerteza associada à homogeneidade .....	59
2.20.	Estudo de estabilidade.....	60
2.20.1.1.	Incerteza associada à estabilidade .....	60
2.21.	Caracterização do candidato a material de referência .....	61
2.21.1.1.	Elipse de confiança.....	61
2.22.	Estimativa da incerteza de medição e atribuição de valor .....	62
<b>2.23.</b>	<b>Resultados e discussão .....</b>	<b>62</b>
2.24.	Validação do método usado para a quantificação dos elementos.....	62
2.25.	Estudo de homogeneidade.....	65
2.25.1.1.	Avaliação da massa mínima para a homogeneidade do material .....	65
2.25.1.2.	Estudo de homogeneidade entre e intra-frasco.....	67
2.25.1.3.	Incerteza associada à homogeneidade .....	70
2.26.	Estudo de estabilidade.....	71
2.26.1.1.	Incerteza associada à estabilidade .....	77
2.27.	Caracterização: o programa interlaboratorial .....	79
2.27.1.1.	Elipses de confiança: avaliação da dispersão dos resultados.....	81
2.28.	Estimativa da fração em massa e incerteza combinada .....	86
<b>2.29.</b>	<b>Conclusões parciais .....</b>	<b>87</b>
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>.....</b>	<b>89</b>
<b>3. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>.....</b>	<b>89</b>
<b>3.1. Objetivos .....</b>	<b>.....</b>	<b>90</b>
3.2.	Objetivo geral.....	90
3.3.	Objetivos específicos .....	90
<b>3.4. Procedimento experimental.....</b>	<b>.....</b>	<b>91</b>
3.5.	Reagentes, soluções e amostras.....	91
3.6.	Instrumentação .....	91
3.7.	Procedimento de digestão das amostras de leite em pó.....	93
3.8.	Procedimento para a determinação simultânea de Cr e Fe em amostras de leite em pó.....	94
<b>3.9. Resultados e discussão .....</b>	<b>.....</b>	<b>94</b>
3.10.	Linhas analíticas usadas para a determinação simultânea de cromo e ferro.....	94
3.11.	Otimização das condições experimentais para as etapas de pirólise e atomização .....	94
3.12.	Características analíticas do método proposto .....	95
3.13.	Aplicação – determinação de cromo e ferro em amostras de leite em pó. ....	98

3.14.	Conclusões parciais .....	98
4.	CONCLUSÕES GERAIS .....	100
5.	REFERÊNCIAS .....	101
6.	APÊNDICE A .....	115
7.	APÊNDICE B .....	124

# CAPÍTULO I

## 1. INTRODUÇÃO

A confiabilidade e rastreabilidade de métodos analíticos são indispensáveis para que os resultados de uma pesquisa tenham aceitabilidade entre a comunidade científica. Nesse sentido, estratégias como comparação através de uma técnica alternativa bem estabelecida, testes de adição e recuperação ou a utilização de um Material de Referência Certificado (MRC) são etapas de uma sequência analítica que confirmam ou não a exatidão do método proposto.

Quando a alternativa de utilizar um MRC é empregada, é importante que esse material tenha não só uma matriz igual ou similar, mas também que a concentração dos analitos compreenda a mesma faixa da amostra que está sendo analisada [1]. Entretanto, MRC geralmente são produzidos em organizações internacionais e possuem um alto custo em função das etapas necessárias para certificação; além do prazo entre a compra e o efetivo recebimento do produto ser geralmente grande, o que pode inviabilizar o andamento de procedimentos de rotina. Esses aspectos, relacionados à custos e logística, são os principais problemas enfrentados por uma grande parte dos laboratórios de pesquisa e empresas.

Neste contexto, uma alternativa aos MRC é a utilização de um Material de Referência (MR), que diferencia de um MRC por não apresentar uma carta com valores certificados do valor de propriedade para cada elemento. Contudo, os MR são substâncias que têm um ou mais valores de propriedades e são suficientemente homogêneos e bem estabelecidos para serem usados na calibração de um equipamento, validação de métodos analíticos e também em processo de controle de qualidade [1, 2].

Para a produção de um MR (certificado ou não) são necessárias quatro etapas básicas: estudo de homogeneidade, estudo da estabilidade, caracterização e avaliação da incerteza [3]. O estudo de homogeneidade é realizado considerando a variabilidade intra-frascos e entre frascos. Já para a estabilidade, estudos a curto e longo prazo devem ser estabelecidos visando obter informações a respeito de condições de transporte e armazenamento, respectivamente. Na etapa de caracterização ocorre a atribuição de valores de propriedades para os elementos de interesse. A incerteza é investigada considerando cada uma etapa do processo de produção e tem o objetivo de refletir possíveis erros sistemáticos e aleatórios.

No Brasil, apesar de existirem iniciativas importantes em grupos de pesquisa em diversas universidades e órgãos como a Embrapa e INMETRO, a produção de MR ainda é pequena e não atende à demanda dos diversos setores. Nesse sentido, há a necessidade de produção de novos materiais para que, principalmente, as regiões mais distantes dos grandes centros urbanos possam ter alternativas para o controle de qualidade dos produtos regionais ou locais.

Na área de alimentos a preocupação é ainda maior, pois elementos como cromo, chumbo e mercúrio, por exemplo, tem a possibilidade de contaminar as amostras tanto no processo de produção quanto no processo de armazenamento e podem trazer riscos graves à saúde humana. O Brasil é caracterizado como um grande produtor de leite, sendo este alimento bastante consumido na forma *in natura* e industrializado através de seus diversos derivados como manteiga, queijo, leite em pó, entre outros. O leite em pó é uma forma desidratada desse alimento, cuja longevidade é prolongada, mas mantém a composição dos alimentos não industrializados.

Portanto, em função do grande consumo do leite e seus derivados existe a importância de monitorar a concentração dos constituintes presentes nesses alimentos não só para verificar o atendimento à legislação vigente, mas também com intuito de detectar a ocorrência de possíveis adulterações, o que ressalta a necessidade de produção de MR para possibilitar confiabilidade e rastreabilidade aos métodos analíticos.

## **1.1. Material de Referência Certificado: importância e alternativa**

Atualmente, é cada vez mais importante a avaliação dos níveis de concentração de diversas espécies, sejam orgânicas ou inorgânicas, em uma grande quantidade de matrizes. Dessa forma, os resultados das análises envolvem não só a tomada de decisões, mas também permitem afirmar ou não, por exemplo, se um determinado produto está de acordo com a legislação vigente em um determinado país. Com o desenvolvimento de métodos analíticos cada vez mais sensíveis e com baixos limites de detecção e quantificação, faz-se necessário o uso de um padrão de referência para permitir a avaliação da confiabilidade dos resultados das análises. Nesse contexto, a utilização de Material de Referência (MR) é umas das ferramentas disponíveis para avaliar a comparabilidade e rastreabilidade das diversas determinações que são realizadas em química analítica.

De acordo com a ABNT ISO GUIA 30 [2], Material de Referência Certificado (MRC) é definido como um material de referência, acompanhado por um certificado, com um ou mais valores de propriedade, certificado por um procedimento que estabelece sua rastreabilidade à obtenção exata da unidade na qual os valores de propriedade são expressos, com cada valor certificado acompanhado por uma incerteza para um nível de confiança estabelecido. Já um Material de Referência (MR) é definido como um material ou substância que tem um ou mais valores de propriedades que são suficientemente homogêneos e bem estabelecidos para ser usado na calibração de um equipamento, na avaliação de um método de medição ou atribuição de valores a materiais.

Além disso, um MR pode ser usado em todas as etapas do processo de medição, desde a calibração de instrumentos, validação de métodos analíticos e também em processo de controle de qualidade [1, 4-9]. Nesse sentido, diversos pesquisadores têm avaliado a eficiência da eliminação da matriz através da comparação entre as curvas de calibração com solução padrão e curvas empregando MRC [10-12]. Para amostragem direta em sólido, massas crescentes de MRC são utilizadas como estratégia de calibração, bem como na avaliação da exatidão dessas metodologias [13-16]. Por exemplo, Gómez-Nieto et al.[13] usaram MRC como estratégia de calibração para determinação simultânea e direta de ferro e níquel em amostras sólidas biológicas por espectrometria de absorção atômica com alta resolução e fonte contínua (HR-CS AAS). Na determinação de nutrientes e minerais tóxicos em arroz e vegetais por meio de instrumentos de análise de ativação de nêutrons (INAA), a

concentração de cada elemento foi obtida por comparação com vários MRC em estudo relatado por Parengam et al.[15]. Mior et al.[14] empregaram MRC não apenas na etapa de calibração, mas também no estudo da exatidão durante a determinação de enxofre em carvão usando análise de amostras sólidas através da espectrometria de absorção molecular com alta resolução e fonte contínua em forno de tubo de grafite (HR-CS GF MAS). Esses exemplos refletem a importância dos MRC durante várias etapas de um processo de medição.

Em função de muitas matrizes, sejam elas ambientais, de alimentos, amostras biológicas, dentre outras, é imprescindível o uso de MR (certificado ou não) para que os resultados sejam avaliados quanto à aspectos como exatidão, confiança e comparabilidade. Assim, é importante que o MR tenha alta similaridade com a amostra a ser analisada, visando refletir nesse material os mesmos inconvenientes analíticos que podem ser apresentados na amostra real [17].

No entanto, é muitas vezes difícil a obtenção de materiais de referência com matriz igual ou similar à amostra em análise para validação do método, calibração e controle de qualidade [18, 19]. Em muitos casos, apesar de existir MRC em matriz de característica similar, os analitos de interesse não compreendem a mesma faixa de concentração da matriz analisada [1]. Além disso, os MRC que estão disponíveis em geral têm preço elevado, em função das etapas de certificação que são demoradas e dispendiosas [20].

Tendo em vista que a elaboração de um MRC constitui um processo lento, meticuloso e dispendioso, não é possível satisfazer a demanda de todos os tipos e quantidades de MRC [21]. Para atender a essa demanda, um MR pode servir de alternativa ao MRC no desenvolvimento de métodos e controle de qualidade [1]. No Brasil, por exemplo, a produção de MRC ainda é baixa, atendendo principalmente algumas medições específicas nos setores de indústria e saúde, sendo necessário ainda a importação de grande quantidade de MRC do exterior [22].

Os MR também conhecidos como Material de Referência de Laboratório (MRL) ou Material de Controle de Laboratório (MCL), que embora o processo de produção não inclua o estabelecimento de valores certificados e, em função disso, seja mais barato do que um MRC, também devem cumprir os mesmos critérios de homogeneidade e estabilidade para assegurar a sua utilização [23-25]. No Grupo de Pesquisa em Química e Quimiometria (GRPQQ) da

Universidade Federal da Bahia já foram desenvolvidos MRL para análise inorgânica em algumas matrizes [1, 26, 27].

Portanto, é crucial que a comunidade científica empreenda mais esforços no sentido de preparar e caracterizar novos MR nas mais variadas matrizes, para atender à demanda existente. Nesse sentido, a literatura indica que o foco para o desenvolvimento de novos MRC está nas matrizes de alimentos, água, solo e sedimentos [8]. Assim, a necessidade de contribuir para o desenvolvimento tecnológico do país aumentando a disponibilidade de materiais de referência em diversas áreas, tornou-se meta de pesquisadores e instituições [28].

No Brasil, o setor alimentício tem grande destaque no Produto Interno Bruto (PIB), sendo que muitos dos alimentos são destinados ao consumo interno e também para a exportação. Nesse sentido, o Ministério da Saúde estabeleceu os Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos [29], visto que alguns contaminantes, como é o caso de chumbo e cádmio, são bastante deletérios à saúde humana mesmo em concentrações-traço.

Desse modo, para que se possa garantir que um produto atenda aos requisitos, tanto nacionais quanto internacionais, é necessário que metodologias de análises ofereçam resultados exatos e precisos a fim de assegurar a qualidade do produto, bem como garantir que todas as barreiras sanitárias e de comércio exterior, incluindo aquelas que atendam aos limites dos metais potencialmente tóxicos, sejam satisfeitas [28].

## **1.2. A produção de Material de Referência no Brasil**

A importância para o desenvolvimento de MR pode ser avaliada desde a década de 70 com a criação da Cooperação para Ciência e Tecnologia na Europa e o avanço das agendas de pesquisa da União Europeia e a decisão dos Estados-Membros em incluir um programa para organizar estudos interlaboratoriais e desenvolver MRC como base das atividades do Joint Research Centre (JCR). Esse pequeno programa de medição foi chamado de Community Bureau of Reference (ou BCR). Atualmente, a sigla BCR alcançou amplo reconhecimento na comunidade analítica europeia e é reconhecido por laboratórios em todo o mundo. Enquanto isso, nos EUA, o National Bureau of Standards (NBS), que mais tarde se tornou o National Institute for Standards and Technology (NIST), fornecia suporte de MR desde 1906 [8].

Apesar de reconhecida a relevância da utilização de Materiais de Referência na validação de métodos analíticos e controle de qualidade, sua produção e distribuição no Brasil ainda é aquém do desejado. Impulsionado pelo crescimento industrial do século XX, fortaleceu-se a necessidade de criar no país instrumentos eficazes de controle de qualidade para proteger produtores e consumidores. Em 1961, foi criado o Instituto Nacional de Pesos e Medidas (INPM) centralizando a política metrológica nacional. Em 1973, um projeto de Lei propõe a ampliação das atribuições do INPM e sua reformulação transformando-o em Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial – INMETRO conhecido até os dias atuais [30].

Nesse sentido, com a criação do INMETRO é inevitável a produção de padrões de referência para possibilitar maior confiabilidade dos resultados obtidos. O início da produção de MR para análise química no Brasil ocorreu em 1975 com a criação do Núcleo de Padrões Analíticos, atualmente Agrupamento de Materiais de Referência, pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT) [31]. Ao longo dos anos foram desenvolvidos mais de 130 tipos de MRC que tem sido utilizados nas diversas áreas, tais como indústria, universidade, centro de pesquisa e desenvolvimento, agências reguladoras oficiais, entre outras entidades [32]. O INMETRO tem desenvolvido diversos materiais, tais como etanol em água, contaminantes orgânicos em cachaça, solução tampão etc.

O Centro de Tecnologia Mineral, CETEM, desenvolveu projetos envolvendo pesquisa tecnológica para o processamento mineral e metalúrgico e a prestação de serviços para a indústria mineral. Desde que foi criado, o CETEM já produziu 20 MRC, sendo 16 diferentes tipos de composições químicas de bauxita, 1 minério de sulfetos de cobre, 1 concentrado de sulfetos de cobre e 2 resíduos de mineração, os quais são distribuídos no Brasil e no exterior [33].

A produção de MR em matrizes biológicas teve início a partir de 1982 pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade na Saúde (INCQS) e pela Fundação Oswaldo Cruz/Ministério da Saúde para o controle de qualidade de produtos sujeitos à vigilância sanitária [31]. Fundada em 1995 para prestação de serviços em metrologia, a VISOMES desenvolve desde 2011 MRC de padrões de pH e condutividade [34].

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), criada em 1973, entidade vinculada ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento vem desenvolvendo MR

para atendimento ao setor da agropecuária brasileira. Assim, a Embrapa disponibiliza os seguintes MR: *Brachiaria brizantha* cv Marandu, suplemento mineral para bovinos, solo arenoso, tecido animal (fígado bovino) e fosfato de rocha [35].

Outras iniciativas importantes têm sido desenvolvidas pelo país visando a obtenção de Materiais de Referência. No âmbito do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), autarquia associada à Universidade de São Paulo, Ulrich e colaboradores [28] prepararam e caracterizaram um MR de peixe. Nesse trabalho, foi produzido e certificado um lote de material em relação ao teor de mercúrio e metilmercúrio, além de valores informativos de chumbo e arsênio. Ainda no IPEN, Moreira e colaboradores [36] desenvolveram um MR de mexilhão e concluíram que há possibilidade de certificação de 11 elementos: As, Ca, Cl, Co, K, Mg, Mn, Na, Se, Th e Zn.

Outro trabalho de destaque realizado no IPEN foi o de preparo, caracterização e certificação de MR isotópicos do urânio na faixa de 0,5 a 20 % de  $^{235}\text{U}$  em massa desenvolvido por Junior e colaboradores [37]. Resultados obtidos pelas mais avançadas técnicas e métodos de espectrometria de massas foram comparados entre si para verificar quais estão associados aos menores valores de incerteza de medição da razão isotópica. A razão isotópica  $n(^{235}\text{U})/n(^{238}\text{U})$  nos materiais produzidos foi certificada com incertezas de medição expandidas na faixa de 0,02 a 0,10 % e as razões  $n(^{234}\text{U})/n(^{238}\text{U})$  e  $n(^{236}\text{U})/n(^{238}\text{U})$ , com incertezas na faixa de 0,03 a 2,20 %.

Em 2017 foi publicado por Castro e colaboradores [38] mais um trabalho desenvolvido no âmbito do IPEN que objetivou o preparo e caracterização de um MR de rim bovino. A avaliação dos resultados de comparação interlaboratorial e dos estudos de homogeneidade e estabilidade possibilitou atribuir valores a 20 elementos com as respectivas incertezas, sendo 9 valores certificados (As, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Se e Zn), 10 valores indicativos (Br, Ca, Cd, Cl, Co, Cs, Hf, Mo, P e Rb) e 1 como informação adicional (Hg).

Silva e colaboradores [39] descreveram o desafio para a obtenção de MR para nutrientes e contaminantes em fosfato de rocha, matéria-prima utilizada para a fabricação de fertilizantes. Após todas as etapas estabelecidas pelas ISO GUIAS 30 a 35, o trabalho possibilitou o desenvolvimento de um Material de Referência de fosfato de rocha para Al, As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, V e Zn que poderá ser utilizado para o controle de resultados analíticos.

No mesmo grupo de pesquisa, dois outros trabalhos foram desenvolvidos. Verhalen e colaboradores [40] prepararam e caracterizaram um MR de solo para nutrientes e contaminantes inorgânicos. A homogeneidade e estabilidade do material apresentaram médias dentro do intervalo de confiança de 95 % para As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Pb, possibilitando, após o ensaio colaborativo, a atribuição de valores de referência para os respectivos elementos. Bossu e colaboradores [31] desenvolveram um MR de forrageira para nutrientes e contaminantes inorgânicos e após todas as etapas do estudo, os resultados indicaram valores de consenso para 13 elementos, que foram determinados por meio de ensaio colaborativo.

Gandra e colaboradores [41] da Universidade Federal de Minas Gerais produziram e avaliaram um MR para umidade, cinzas, frações em massa de gorda total e acidez titulável em leite em pó integral. Os resultados preliminares indicam que o MR produzido é adequado para avaliar a exatidão e poderá ser submetido a uma caracterização interlaboratorial posterior.

No Grupo de Pesquisa em Química e Quimiometria (GRPQQ) da Universidade Federal da Bahia, três trabalhos foram desenvolvidos visando a obtenção de MR em diferentes matrizes alimentícias. Dos Santos e colaboradores [26] realizaram uma pesquisa com a finalidade de preparar e certificar um MR botânico (folhas de soja – *Glycine Max.I*) para alguns elementos de importância nutricional e ambiental. Após todas as etapas de preparo e certificação do material, os elementos Ca, Mg, K, N, Mn, Cu e Zn tiveram seus valores de concentração certificados, além de valores informativos para outros elementos.

Lima [42] preparou um MR de farinha de trigo e aplicou técnicas de análise multivariada na caracterização de analitos inorgânicos. Dessa forma, treze laboratórios participaram do programa interlaboratorial com dezesseis resultados independentes e dez componentes da farinha de trigo tiveram seus teores caracterizados, sendo eles: Ba, Cu, Mn, Zn, Fe, Ca, Sr, Mg, K e P. Conclui-se que o MR pode ser utilizado no monitoramento da reprodutibilidade dos procedimentos de análise de farinha de trigo.

Por último, Dos Santos e colaboradores [20] desenvolveram e aplicaram um novo MR de farinha de milho. Após os estudos de homogeneidade, estabilidade e análise interlaboratorial foi possível caracterizar o teor de 8 componentes da farinha de milho: Ca, K, Mg, P, Cu, Fe, Mn e Zn. Foram aplicadas as técnicas de análise por agrupamento hierárquico

(HCA) e análise de componentes principais (PCA) como método alternativo aos recomendados pela ISO Guia 35:2006.

Apesar não só da importância da utilização de Materiais de Referência em métodos analíticos, mas também da necessidade de atender à uma demanda regional, verifica-se que a produção desses materiais no Brasil ainda está em desenvolvimento. Instituições como IPT, INMETRO, CETEM e VISOMES possuem 138 MRC cadastrados na base de dados do Banco Internacional de Dados de Materiais de Referência Certificados (COMAR) [39] e são, no Brasil, os principais produtores. Contudo, é importante enfatizar as iniciativas que vem sendo desenvolvidas no âmbito das instituições de ensino do país.

### **1.3. Tendências atuais e desafios para o desenvolvimento de MRC**

Desde o início da década passada já era reconhecido que uma produção significativa de MR (certificados ou não) seria necessária para responder à demanda crescente nos próximos anos. Nessa perspectiva, a produção dos chamados Materiais de Referência de Laboratório (MRL) para análise de rotina em grandes quantidades e a custos mais baixos em relação aos MRC, já estavam sendo discutidos por especialistas em todo o mundo [43]. Dessa forma, uma avaliação das tendências do desenvolvimento de MRC é útil para orientar a produção dos novos materiais de acordo com a necessidade dos laboratórios [8].

As tendências para o desenvolvimento de novos MR (certificados ou não) estão estritamente relacionadas com as normas regulatórias vigentes. Nesse sentido, desde os anos 80, a Comissão Europeia (CE) tem apoiado programas de investigação destinados a melhorar a qualidade das medições físicas, biológicas e químicas através do uso de Materiais de Referência apropriados [44]. A União Europeia indicou uma série de requisitos que contribuem para a confiabilidade e comparabilidade dos resultados das medições, conforme Figura 1. Os estados membros são obrigados a usar esse sistema para inspeção da qualidade do ar, das águas, do solo, produtos alimentares etc [44].

Entre todos os elementos mostrados na Figura 1, um papel essencial na garantia da alta qualidade dos resultados nesse conjunto de ferramentas é desempenhado pelos MR e, em particular os MRC [44-46]. Portanto, principalmente em relação à produção de MR, as

normas regulatórias vigentes em um país têm um papel fundamental no delineamento da produção desses materiais.

**Figura 1** – Aspectos do sistema de controle e garantia de qualidade das medições

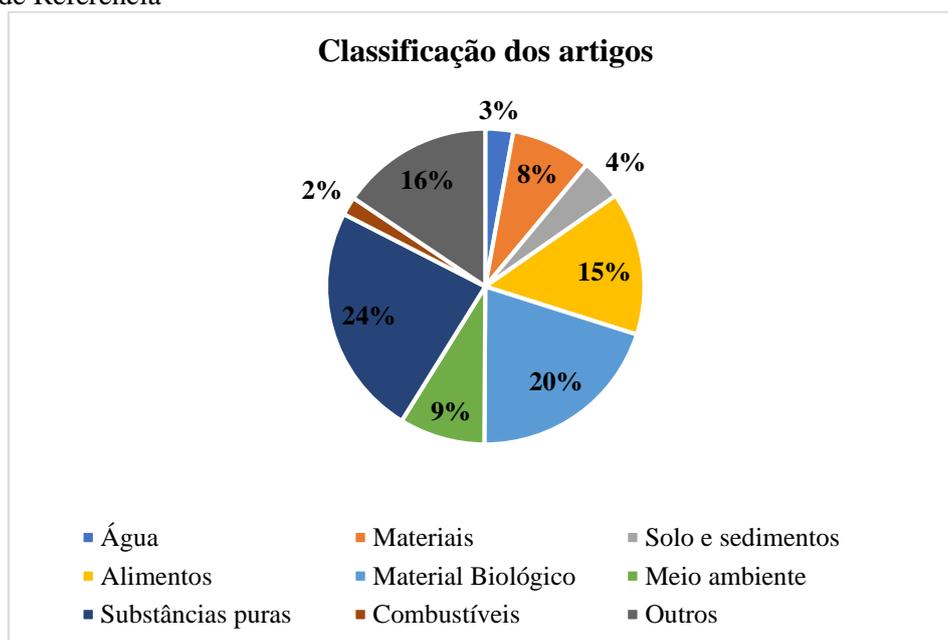


Fonte: Adaptado de Ulberth (2006, p. 1122).

Em um estudo a respeito das tendências em MRC para a especificação de elementos-traço, Cornelis e colaboradores [47] já enfatizaram essa questão. Segundo os autores, uma vez que as espécies dos elementos em matrizes particulares são impostas pela legislação e/ou reguladas em escala nacional ou internacional, a disponibilidade de MRC para as espécies regulamentadas torna-se obrigatória. Assim, as tendências emergentes no desenvolvimento de MR é para atender aos requisitos do Controle de Qualidade Analítico (AQC, do inglês *Analytical Quality Control*) das áreas de saúde alimentação, nutrição e saúde ambiental [48].

Recentemente um trabalho de revisão traz um levantamento a respeito da publicação de artigos relacionados à produção de Materiais de Referência. Para obtenção dos resultados, a pesquisa foi realizada nas seguintes bases de dados: *Scifinder*, *Science Direct* e *Scopus*, conforme apresentado na Figura 2.

**Figura 2** – Classificação do assunto de todos os 1056 artigos pesquisados referente à produção de Materiais de Referência



Fonte: Adaptado de Olivares (2018, p. 57).

Os resultados apresentados na Figura 2 corroboram com aquelas tendências mencionadas há 20 anos, que indicam que o foco no desenvolvimento de MRC está nas matrizes de alimentos, água, solo e sedimentos [8, 48]. Outrossim, dos 26 artigos publicados nessas áreas nos últimos dois anos, aproximadamente 77 % são na área de alimentos. Em função da crescente demanda, os projetos que levam à produção de um MRC estão aumentando gradualmente, além da exigência em termos de processamento de dados [49].

Para a certificação de materiais para compostos orgânicos os desafios são ainda mais acentuados. O desenvolvimento de tais MRC encontra severas restrições na preparação, armazenamento e uso, que são agravados pela dificuldade de manter a matriz e os analitos homogêneos e estáveis [50].

De maneira geral, além da complexidade em desenvolver um novo MR, o custo na maioria das vezes é um aspecto a ser avaliado. Durante todo o processo são necessários equipamentos de grande porte, como por exemplo na etapa de irradiação da amostra a ser certificada, que tem o objetivo de eliminar os micro-organismos e prevenir sua reprodução, o que pode onerar ainda mais esse processo [51].

A etapa final de certificação do material pode ser realizada em um único laboratório ou através de uma análise interlaboratorial. No primeiro caso, que é frequentemente a

abordagem escolhida pelo instituto americano *National Institute of Standards and Technology* (NIST) consome menos tempo, mas requer um centro científico bem estabelecido de extrema competência capaz de dominar os inúmeros desafios experimentais das fases de produção de um MRC. Utilizando a estratégia de análise interlaboratorial, apesar de demandar um maior tempo, as despesas associadas à certificação são compartilhadas entre os laboratórios que aceitarem participar dessa campanha [52].

#### **1.4. O leite em pó**

O leite e os produtos lácteos, amplamente consumidos em todo o mundo, são uma importante fonte de nutrientes benéficos para os seres humanos em função de sua composição química essencial, tais como proteínas, carboidratos, minerais e vitaminas [53-55]. É comum ocorrer a adulteração do leite em muitos países. Nesse sentido, a forma comum de adulteração é parcial ou ocorre a completa substituição do leite mais caro por um tipo mais barato. A maior motivação da adulteração é econômica, mas seu impacto é uma preocupação de saúde pública por causa dos efeitos adversos em alguns consumidores [56].

Fraudes mais sofisticadas (e, portanto, mais difíceis de detectar) foram relatadas na literatura incluindo a adição de melamina para aumentar o teor de nitrogênio no leite após a diluição com água [55, 57]. Assim, em função não só da grande quantidade de elementos essenciais, mas também dos possíveis contaminantes que podem ser adicionados tanto ao leite em pó quanto em seus derivados, é primordial a utilização de métodos analíticos confiáveis para o controle de qualidade desses produtos.

O leite consiste em uma matéria-prima heterogênea, cuja composição é afetada tanto por fatores genéticos quanto por fatores ambientais. O leite e seus derivados são sistemas muito instáveis, o que pode ocasionar modificações físicas e químicas durante seu processamento e armazenamento. Portanto, a produção de MR a partir do leite surge principalmente da necessidade de assegurar uma confiança suficiente a todo o procedimento analítico desde o manuseio da amostra até a interpretação dos dados [58]. Ademais, a preparação e certificação de um material que pode ser aplicado na avaliação da qualidade do leite e seus derivados é fundamental para o avanço da metrologia química e garantia da qualidade analítica dos resultados obtidos da análise dessas matrizes [41].

Segundo dados preliminares do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), no primeiro trimestre de 2020, a quantidade de leite cru adquirida e industrializada no Brasil foi de pouco mais de 6 milhões de litros. A pesquisa fornece informações sobre as quantidades de leite cru adquirido, leite cru recebido por transferência, leite destinado à industrialização e leite cru vendido ou transferido a outros estabelecimentos [59].

Em função da grande produção e, conseqüentemente, alto índice de consumo de leite e seus derivados em todo o mundo, pesquisadores vem desenvolvendo novas metodologias analíticas visando a determinação de macro e microelementos nesses produtos. Na Tabela 1 encontra-se um resumo desses trabalhos publicados na última década.

**Tabela 1** - Resumo de trabalhos publicados na última década para a determinação de elementos em leite em pó e seus derivados

<b>Matriz</b>	<b>Elementos</b>	<b>Técnica Analítica</b>	<b>Referência</b>
Leite em pó e suplementos alimentares	Ca, K e Mg	LIBS	[60]
Leite em pó	Ca, Cu, Fe, K e Na	ICP OES	[53]
Leite em pó	Ca, Fe, K, Mg, Na, B, Ba, Cd, Cu, Mn, Mo, Pb, Sr e Zn	ICP OES ICP-MS	[61]
Leite em pó integral e desnatado	Ca, Cu, K, Fe, Mg, Mn, Na, P e Zn	ICP OES	[62]
Leite em pó	Br e I	ICP OES ICP-MS	[63]
Leite em pó	Cu e Zn	FAAS	[64]
Fórmulas lácteas infantis	K, Ca, Fe, Zn, Br, Rb e Sr	EDXRF	[65]
Leite em pó adulto e infantil	Ba, Ca, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Sr, V e Zn	ICP OES	[66]
Leite em pó	Ca e Mg	HR-CS FAAS	[67]
Leite e produtos lácteos	Na	Eletroforese capilar	[68]

Fonte: Autor (2020).

Vale ressaltar que, na literatura existem trabalhos que reportam a produção de MR a partir do leite em pó, entretanto nenhum deles se destina à avaliação de espécies inorgânicas [41, 46, 69].

Gandra et al. [41] produziram um MR para umidade, cinzas, frações em massa de gordura total e acidez titulável em leite em pó integral. Os resultados iniciais indicaram que o material é considerado homogêneo e estável para as espécies de interesse nas condições estabelecidas e poderia ser submetido a outras análises para caracterização.

Shehata e colaboradores [46] produziram dois MR para trans-retinol, palmitato de retinil,  $\alpha$ - e  $\gamma$ -tocoferol em leite em pó e fórmula infantil, no Instituto Nacional de Padrões, no Egito. Após estudos de homogeneidade, estabilidade, caracterização e avaliação da incerteza foi possível afirmar que os dois MR podem fornecer uma boa base para melhorias adicionais na garantia de qualidade de análise de vitaminas no leite em pó e fórmula infantil.

Judprasong e colaboradores [69] desenvolveram um MR para leite em pó e seu uso na avaliação do desempenho de laboratórios em análise de nutrientes obrigatórios para rotulagem nutricional da Tailândia. Para esse Teste de Proficiência (TP), vinte laboratórios participaram do estudo e o desempenho de cada um foi avaliado através do teste z-scores ( $|z| \leq 2,0$  para resultados satisfatórios). As espécies de interesse foram: gordura total, gordura saturada, colesterol, proteína, açúcar, sódio, vitamina B1, vitamina B2, cálcio, ferro, umidade e cinzas. Os valores desses nutrientes (média e desvio padrão) obtidos no TP foram usados para atribuição dos valores de propriedade do MR, que poderá ser usado como amostra de controle de qualidade ou como material de TP com valores referenciais de nutrientes entre os laboratórios da Tailândia.

## 2. CONSIDERAÇÕES SOBRE O PREPARO E A CARACTERIZAÇÃO

### 2.1. Guia para a produção de Material de Referência

Com o objetivo de estabelecer e fornecer orientações aos produtores de MR, onde são abordados os requisitos para a garantia da qualidade e rastreabilidade do material preparado, sete guias que são reconhecidas internacionalmente foram publicadas pela *International Organization for Standardization* (ISO), sendo que as normas de 30 a 34 já foram traduzidas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) [2, 3, 17, 21, 70-72]:

✓ **ISO Guia 30, (1992)** – apresenta os principais termos e definições associados em relação aos materiais de referência.

✓ **ISO Guia 31, (2000)** – apresenta as informações que devem constar em um certificado de material de referência.

✓ **ISO Guia 32, (1997)** – descreve as recomendações gerais para problemas relacionados à calibração associada à análise química e a seleção e uso de materiais de referência internos e dos MRC.

✓ **ISO Guia 33, (2000)** – apresenta recomendações para o uso de materiais de referências na verificação da exatidão de métodos.

✓ **ISO Guia 34, (2000)** – é uma guia para o produtor de MRC, com requisitos necessários para a produção dentro de um sistema de qualidade quanto às instalações, planejamentos, preparação, armazenagem, ações pós-distribuição, entre outras.

✓ **ISO Guia 35, (2017)** - fornece orientações para caracterização e avaliação da homogeneidade e estabilidade durante a preparação de um MR ou MRC.

✓ **ISO Guia 13528, (2015)** - detalha os métodos estatísticos para uso em testes de proficiência em comparações interlaboratoriais.

Ao planejar o desenvolvimento de um novo material o produtor deve evitar ou minimizar a ocorrência de fatores que possam influenciar, principalmente (mas não somente), na homogeneidade do material. Conforme estabelece a ISO GUIA 34, na etapa inicial de

preparação do material, recomenda-se, quando apropriado, que sejam utilizados procedimentos que incluam: análise qualitativa, moagem, mistura, peneiramento e quarteamento. Recomenda-se também etapas de determinação da distribuição do tamanho de partículas, secagem e esterilização e subdivisão do material em embalagens individuais representativas de todo o lote [70].

## **2.2. Caracterização granulométrica**

Um estudo para avaliar o tamanho médio das partículas do material usado para o desenvolvimento de um novo MR é necessário, pois a presença de partículas suficientemente pequenas de tamanho homogêneo é importante para evitar a segregação do material e sua consequente heterogeneidade [73]. No caso de materiais de matriz de origem metálica ou geológica, nos quais a existência de partículas e agregados com fases diferentes é possível, o problema é mais crítico. Em materiais de origem biológica o problema é menos preocupante, mas, ainda assim, deve-se realizar a caracterização da granulometria para garantir que os MR sejam preparados com homogeneidade adequada [36].

Geralmente, para se obter um material com homogeneidade desejada é necessário que seja empregada uma etapa de trituração e moagem. Além disso, a diminuição do tamanho de partículas acarreta um aumento da área superficial da amostra, o que facilita a dissolução em solvente ou o ataque ácido para a decomposição [20]. No entanto, essas etapas podem causar prejuízos na análise, tais como risco de contaminação ou perdas, pois os materiais utilizados nos moinhos incluem aço inoxidável, ágata, óxido de zircônio, carbetto de tungstênio, titânio etc. Em alguns casos, a amostra pode ser finamente moída, o que a torna pouco representativa da amostra real [74].

Além disso, perdas de compostos voláteis podem ocorrer em função do aquecimento que ocorre devido ao atrito no processo de moagem. Uma alternativa para evitar esse tipo de problema é a utilização da moagem criogênica, que tem sido recomendada para amostras com altos teor de fibras e gorduras, e por ocorrer na temperatura de liquefação do nitrogênio (-196 °C) o risco de eventuais perdas de compostos por volatilização é minimizado [75].

### **2.3. Processo de esterilização com raios gama**

Tratamentos físicos baseados em irradiação de alta energia são métodos atraentes para o controle de ameaças biológicas, não apenas por razões de segurança, mas também por questões de conservação. O uso de radiação é – em princípio – altamente desejável, pois é muito eficiente, pode ser conduzido em condições seguras e, acima de tudo, não destrutivo. O uso extensivo dessa abordagem é conhecido há muito tempo em procedimentos de esterilização e conservação de alimentos [51].

A eficiência da radiação ionizante (especialmente raios gama e raios-X), usada como método de esterilização, reside em boa penetração na matéria e alta eficácia na inativação de microrganismos [76]. A irradiação com raios gama, que é um processo não térmico, é bastante utilizada na esterilização de uma grande variedade de produtos e materiais do campo de suprimentos médicos, produtos farmacêuticos, cosméticos, indústria alimentícia e patrimônio cultural, além de materiais de madeira com o objetivo de melhorar seu prazo de validade [51, 77].

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou o regulamento técnico para irradiação de alimentos através da resolução RDC nº 21 de 26 de janeiro de 2001 [78]. De acordo com essa resolução a irradiação de alimentos é um “processo físico de tratamento que consiste em submeter o alimento, já embalado ou a granel, a doses controladas de radiação ionizante, com finalidades sanitárias, fitossanitárias e/ou tecnológicas”. As fontes de radiação são aquelas autorizadas pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, de acordo com as normas pertinentes, a saber [78]:

- a) Isótopos radioativos emissores de radiação gama: cobalto 60 e célio 137;
- b) Raios X gerados por máquinas que trabalham com energias de até 5 MeV;
- c) Elétrons gerados por máquinas que trabalham com energias até 10 MeV.

Na literatura, a utilização de radiação gama com  $^{60}\text{Co}$  tem sido reportado com o objetivo de avaliar as propriedades físico-químicas de alguns alimentos [77, 79, 80]. Além disso, trabalhos que objetivaram o desenvolvimento de MR de farinha de milho, rim bovino e mexilhão também já foram realizados com as doses de radiação gama de  $^{60}\text{Co}$  de 15 kGy, 10 kGy e 5 kGy, respectivamente [20, 36, 38].

As mudanças químicas que ocorrem nos alimentos irradiados são devido ao resultado da ação direta da radiação nos carboidratos, proteínas, gorduras e outros compostos presentes no alimento e também pelo efeito dos intermediários reativos formados durante a radiólise da água. Os minerais presentes nos alimentos não têm sua composição afetada [36, 81].

Portanto, uma questão fundamental na aplicação de raios  $\gamma$  é a preservação físico-química, bem como das propriedades estruturais e mecânicas dos materiais irradiados, uma vez que uma mudança significativa de propriedades pode comprometer o uso dos materiais para o propósito pretendido [51].

Uma outra etapa importante é a de caracterização, em que o produtor deve descrever o procedimento para estabelecer a qualidade dos materiais como um componente do sistema de qualidade [70].

#### **2.4. Caracterização de um Material de Referência**

A produção de um novo MR é um processo bastante complexo e que requer várias etapas. Após avaliação da viabilidade de melhores estratégias para a produção de um novo material, que obviamente depende de cada matriz, é necessário desenvolver quatro etapas básicas: estudo de homogeneidade, estudo da estabilidade, caracterização e avaliação da incerteza [8, 82].

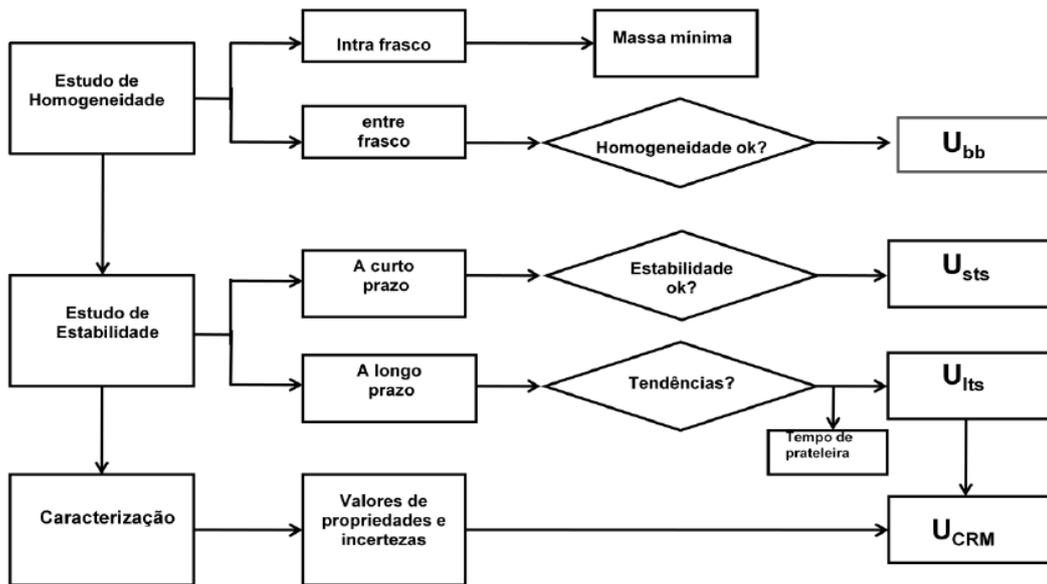
De acordo com a ISO GUIA 34, a caracterização de um MR/MRC deve seguir quatro abordagens, que incluem a realização de medições, empregando-se: 1) um método primário único (definitivo) por uma só organização; 2) dois ou mais métodos de referência independentes, por uma organização; 3) uma rede de organizações qualificadas que utilizem métodos de exatidão adequado e tenham uma avaliação de incerteza de medição conhecida e aceitável; 4) método específico em um estudo interlaboratorial realizado em diferentes laboratórios [70]. No processo de certificação de MR, o NIST vem usando diferentes abordagens para atribuição de valor de propriedades em seus diversos materiais.

Em vários estudos publicados na literatura, a caracterização é conduzida através de uma série de medidas de frações do material com a participação de uma rede de laboratórios, por meio de uma comparação interlaboratorial [1, 8, 83]. Nesse sentido, a ISO GUIA 35

estabelece que a caracterização deve incluir cinco ou mais participantes, fornecendo dados tecnicamente válidos [3].

Todas as etapas de desenvolvimento de MR são mostradas na Figura 3, em que é possível observar que a etapa de caracterização, ou seja, a atribuição de valores de propriedades e incertezas, consiste no estágio final de todo o planejamento.

**Figura 3** – Fluxograma das etapas de um processo de certificação de um MR\* [84]



Fonte: adaptado de van der Veen (2001, p. 292).

\* $u_{bb}$  – incerteza padrão associada com a variabilidade entre frascos;  $u_{sts}$  – incerteza padrão associada à estabilidade a curto prazo;  $u_{Its}$  – incerteza padrão associada à estabilidade a longo prazo;  $U_{CRM}$  - incerteza expandida associada com o valor de propriedade do MRC.

É possível verificar que, para cada etapa do processo de desenvolvimento de um novo MR, uma incerteza está associada.

## 2.5. Estudo de homogeneidade

De acordo com a ISO GUIA 35 [3], na prática, um material é considerado homogêneo em relação a uma dada característica se uma diferença entre os valores dessa característica de uma parte (ou item) para outra é insignificante quando comparada ao componente de incerteza de, por exemplo, caracterização. Já a ISO GUIA 30 [2] estabelece que, em amostras tomadas de embalagens diferentes ou em embalagens iguais, um MR é dito homogêneo com respeito a uma dada propriedade se o valor da propriedade determinado por ensaios em amostras de tamanho determinado encontra-se dentro dos limites de incerteza especificados.

Após as etapas iniciais de preparo de um novo MR (trituração e homogeneização, por exemplo), a avaliação da homogeneidade é uma das mais importantes, pois esse estudo é o grande delineador das próximas etapas.

Um tópico importante a ser avaliado é a necessidade de explorar o número de amostra e os analitos. Entre os diferentes testes de homogeneização, o procedimento principal, independente do tipo de amostra, é a escolha de um subconjunto de analitos para avaliar a homogeneidade [8]. A ISO GUIA 35 [3] estabelece para o teste de homogeneidade que o número de frascos seja selecionado aleatoriamente através de um esquema de amostragem adequado, geralmente incluindo de 10 a 30 unidades do lote preparado. O planejamento para verificar a homogeneidade de um lote de MR deve indicar as variabilidades da amostra dentro do recipiente assim como entre os recipientes que contêm os materiais que compõem o lote, devidamente envasados [40].

As medidas para o estudo de homogeneidade devem ser realizadas em condições de repetitividade, ou seja, mesmo laboratório, mesmo analista e todas as amostras testadas no mesmo dia [3, 40]. Dessa forma, conforme pode ser verificado na Figura 3, o estudo da homogeneidade da distribuição dos analitos deve ser realizado intra e entre frascos.

O principal teste é o estudo de homogeneidade entre frascos, o qual é utilizado para garantir que não há variação nas propriedades de interesse ao longo do lote de frascos do material, sendo também utilizado na estimativa da contribuição da heterogeneidade residual para a incerteza dos valores certificados [36]. Nesse sentido, na homogeneidade entre frascos as amostras são selecionadas de forma aleatória e, após a quantificação dos elementos de interesse, o produtor do novo MR irá decidir, dentro de um nível de incerteza apropriada, se uma amostra individual é ou não representativa de todo o lote.

Após o programa colaborativo para obtenção de um novo MR os valores de propriedade são representativos de todo o lote do material, o que significa que qualquer frasco do lote produzido terá coerência com o valor informado. Nessa perspectiva, o impacto da não homogeneidade de um dado material pode ser reduzido consideravelmente com a descrição de uso apropriado [39]. Diferenças que possam existir entre unidades individuais do candidato a MR podem ser refletidas na incerteza para o relatório do certificado [26].

Em termos estatísticos, o preparo de um MRL deve satisfazer os seguintes objetivos [20]:

- 1) detectar se a variação intra-frasco é estatisticamente expressiva em comparação com a variação conhecida do método;
- 2) detectar se a variação entre frascos é estatisticamente significativa em comparação com a variação intra-frascos.

Uma forma de verificar se a variação é estatisticamente expressiva é comparando-se o coeficiente de variação (CV) ou o desvio padrão relativo (RSD, do inglês *Relative Standard Deviation*) obtidos no estudo das medidas intra-frasco com o resultado do estudo entre frascos.

A avaliação e a estimativa da incerteza do estudo de homogeneidade são baseadas na ISO GUIA 35 [3], através da Análise de Variância (ANOVA). A ANOVA fator único é um parâmetro estatístico usado para determinar as diferenças significativas entre as médias de três ou mais grupos [85]. Porém, esse tipo de avaliação pode conduzir a conclusões errôneas em duas situações [28]:

- 1) se o método analítico usado for pouco preciso, possíveis heterogeneidades não são detectadas e o teste indicará que o material é homogêneo;
- 2) se o método analítico é bastante preciso, o teste indicará que o material é heterogêneo, pois qualquer pequena diferença na concentração do analito dos frascos produzirá um resultado significativo de heterogeneidade.

Diante das limitações apresentadas quando se utiliza a ANOVA no tratamento dos dados, alguns pesquisadores têm utilizado como alternativa a análise exploratória de dados [1, 42, 86, 87]. A aplicação da análise exploratória de dados se expandiu nos últimos anos devido, entre outras coisas, a uma ênfase crescente na análise química de alta produtividade, na qual os pesquisadores estão frequentemente interessados em diferenciar os estados químicos dos materiais [86].

De acordo com as recomendações da ISO GUIA 35 [3], as incertezas em virtude da falta de homogeneidade entre frascos ( $u_{bb}$ ) pode ser calculada pelas Equações (1) e (2) [20]:

$$u_{bb} = \sqrt{\frac{MS_{inter} - MS_{intra}}{n_0}} \quad \text{Equação (1)}$$

$$u_{bb} = \sqrt{\frac{MS_{inter}}{n}} \cdot \sqrt[4]{\frac{2}{v_{MS\ intra}}} \quad \text{Equação (2)}$$

em que  $MS_{inter}$  e  $MS_{intra}$  são as médias quadráticas entre e dentro do grupo, respectivamente, obtidos da ANOVA, e  $n_0 = n$  e é o número de replicatas por frasco.  $v_{MS\ intra}$  é o número de graus de liberdade intra-frasco. Quando  $MS_{inter}$  é maior do que  $MS_{intra}$ , ambas as equações são aplicadas e o maior valor  $u_{bb}$  é escolhido. Por outro lado, se  $MS_{inter}$  é menor do que  $MS_{intra}$ , o que indica baixa repetitividade do método de medição, apenas a Equação (2) pode ser usada.

## 2.6. Estudo de estabilidade

Em conformidade com a ISO GUIA 34 [70], os testes de estabilidade só devem ser realizados após ter sido demonstrado que o material é homogêneo. Esse estudo tem o objetivo de investigar se os valores de propriedades do novo MR a ser desenvolvido serão alterados por influência da temperatura de armazenamento ou transporte do material. Nesse contexto, esse teste é mais importante para o produtor e o usuário, pois esses estudos fornecem a vida útil do MRC e um meio de estimar a contribuição para a incerteza do valor certificado proveniente da possível instabilidade [8].

Geralmente, os testes são baseados na medição dos analitos em diferentes unidades do MR que foram expostas a diferentes temperaturas durante diferentes tempos e é desejável que a composição do material e os analitos que estão sendo certificados permaneçam inalterados durante o teste [27, 88]. A ISO GUIA 35 afirma que existem dois tipos de estabilidade que devem ser consideradas na certificação de um MR [3]:

- 1) a estabilidade a longo prazo do material (por exemplo, prazo de validade) e
- 2) a estabilidade a curto prazo (por exemplo, estabilidade do material considerando as condições apropriadas para transporte).

No estudo de estabilidade a longo prazo, utiliza-se a temperatura na qual o produtor pretende armazenar o MR e está associada ao comportamento do material nas prateleiras do produtor [3, 36]. Nesse estudo, não é necessário que o material seja submetido a condições de temperatura muito extrema, pois o principal objetivo é investigar o material nas condições de temperatura a qual será armazenado pelo produtor. Esse estudo é realizado por um longo

período, até dois anos, com amostras armazenadas em várias temperaturas sendo analisadas em intervalos de tempo predeterminados [89]. Em trabalhos publicados recentemente esse estudo foi realizado por um período máximo de um ano [83, 90].

No estudo de estabilidade a curto prazo o material é submetido a condições de temperaturas mais extremas, tendo em vista que durante o transporte entre o produtor e o consumidor essas condições podem ser atingidas. Em alguns casos não é possível manter condições adequadas, com respeito à estabilidade do MR durante o transporte e, nesse caso, deve-se dar alguma incerteza extra nos valores de propriedade [3].

Para avaliar a estabilidade a curto prazo, normalmente o tempo é de cerca de 2 meses, mas pode ser estendido para 6 a 12 meses para obter informação adicionais sobre a estabilidade a longo prazo. A ISO GUIA 35 [3] estabelece que existem dois projetos experimentais básicos para o estudo de estabilidade a curto prazo e longo prazo:

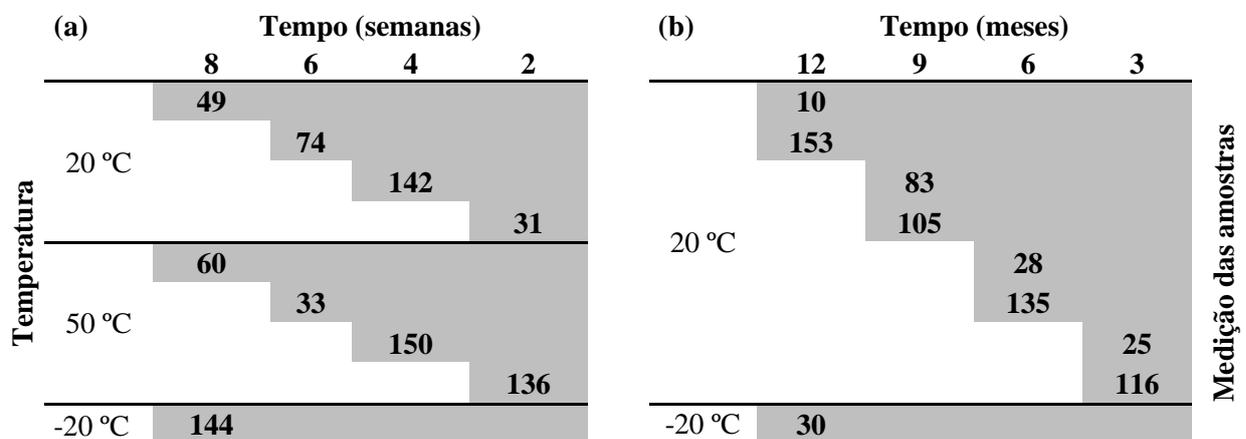
- a) o estudo de estabilidade clássico, e
- b) o estudo de estabilidade isócrono.

No estudo clássico, as amostras individuais preparadas ao mesmo tempo (isto é, um lote), em condições idênticas, são medidas conforme o tempo decorre. Nesse caso, o trabalho é realizado sob condições de reprodutibilidade (dentro do laboratório), levando a uma incerteza relativamente alta, já que a instabilidade do sistema de medição também é incluída [3]

O estudo de estabilidade isócrono pode ser usado quando a duração total do estudo de estabilidade é conhecida e baseia-se num desenho de armazenamento das amostras a diferentes temperaturas para variados intervalos de tempo, permitindo que todas as medições sejam feitas simultaneamente, ou seja, ao final do estudo [91]. A palavra "isócrono" enfatiza que as medições estão todas acontecendo ao mesmo tempo, em vez de distribuídas ao longo do período do estudo de estabilidade, como é o caso da abordagem clássica [3]. A grande vantagem de realizar todas as medições em uma corrida é que reduz a dispersão dos resultados em cada ponto e, portanto, melhora a "resolução" do estudo de estabilidade e, conseqüentemente, levará a uma menor incerteza do que na abordagem clássica [92]. Recentemente foram publicados alguns trabalhos na literatura que empregaram o estudo de estabilidade isócrono [1, 88, 93].

Num estudo para a avaliação da estabilidade de um candidato a material de referência de rim bovino realizado no âmbito do IPEN, Castro e colaboradores [88] utilizaram a abordagem isócrona tanto no estudo de estabilidade a curto prazo quanto a longo prazo. No estudo de estabilidade a curto prazo, 9 frascos foram selecionados aleatoriamente, sendo que 4 foram mantidos à temperatura de  $20 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$  (sala climatizada) e 4 frascos na temperatura de  $50 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  (estufa) e 1 frasco foi armazenado como amostra controle na temperatura de  $-20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  (freezer) para o período de 2, 4, 6 e 8 semanas. Para o estudo de estabilidade a longo prazo o procedimento foi similar, porém 8 frascos foram armazenados à temperatura de  $20 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$  (sala climatizada) e 1 frasco foi armazenado como amostra controle à temperatura de  $-20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  (freezer) num período de 3, 6, 9 e 12 meses, conforme mostrado na Figura 4.

**Figura 4** – Estudo isócrono para (a) estabilidade a curto prazo e (b) estabilidade a longo prazo



Fonte: Castro et al. (2018, p. 1135).

O fato de se utilizar dois frascos para cada tempo para o estudo de estabilidade a longo prazo é uma forma de minimizar a influência da heterogeneidade entre frascos em função da difusão dos resultados em mais unidade [94].

Para avaliação dos dados do estudo de estabilidade o primeiro passo consiste em verificar se qualquer tendência nos dados pode ser observada. Para pequenos problemas de instabilidade em que o mecanismo cinético básico é desconhecido, uma aproximação linear constitui um modelo adequado. No entanto, em casos em que um mecanismo não linear bem definido é a razão da instabilidade, o modelo de degradação correspondente deve ser preferido sobre modelo linear (empírico) [3]. Do ponto de vista empírico, espera-se que a mudança do valor da propriedade (se houver) seja pequena de qualquer maneira, de modo que um simples modelo linear como abordagem de primeira ordem pode ser feita. Em sistemas mais

complexos, em que fenômenos físicos, químicos e biológicos possam afetar a instabilidade do material é imperativo utilizar outra abordagem [92].

Tanto no estudo de estabilidade a curto prazo quanto a longo prazo, a existência de tendências temporais em diferentes temperaturas de trabalho deve ser examinada usando a análise de regressão. Na ausência de tendências, as medições podem ser avaliadas por ANOVA [88, 92].

O método de regressão linear (modelo linear univariado), recomendado pela ISO GUIA 35, tem sido o mais aplicado para avaliar a estabilidade de um candidato a MR. Esse método permite que seja verificada a relação entre duas variáveis: o valor da propriedade (concentração do analito, por exemplo) em função do tempo. Se a inclinação da reta ou a não linearidade forem significativas, ou seja, se a concentração dos elementos não variar ou variar dentro de um nível aceitável em função do tempo, o material é considerado estável. Sendo assim, o elemento é estável se a inclinação da reta,  $|b_1|$ , for menor que o produto entre o  $t$  de Student e o desvio padrão da inclinação em  $b_1$ ,  $s(b_1) \cdot |b_1| < (t_{(0,95, n-2)} \cdot s(b_1))$ , calculados através das Equações (3) a (6) [3]:

$$b_0 = \bar{y} - b_1 \bar{x} \quad \text{Equação (3)}$$

$$s(b_1) = \frac{s}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Equação (4)}$$

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - b_0 - b_1 x_i)^2}{n-2} \quad \text{Equação (5)}$$

$$s(b_0) = s(b_1) \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n x_i^2}{n}} \quad \text{Equação (6)}$$

Sendo que:

x – refere-se aos meses de duração do estudo

y – refere-se à concentração do analito

A incerteza em relação à estabilidade a longo prazo ( $u_{lts}$ ) baseia-se na curva de regressão obtida para a concentração do analito em função do tempo de estudo de estabilidade a longo prazo. Quando a tendência não é significativa, a incerteza na determinação do coeficiente angular  $s(b_1)$  da curva de regressão pode ser considerada como a incerteza

correspondente à determinação do grau de degradação do material. A incerteza referente à estabilidade a longo prazo ( $u_{lts}$ ) pode ser estimada usando a Equação (7) [88]:

$$u_{lts} = s(b_1) \cdot t \quad \text{Equação (7)}$$

Para essa estimativa, um tempo de vida útil ( $t$ ) deve ser definido. Quanto maior o prazo de validade, maior será a contribuição da incerteza para a estabilidade.

## **2.7. Programa colaborativo para atribuição de valor de propriedade**

De acordo com a ISO GUIA 34, são reconhecidos quatro procedimentos principais para a certificação de materiais de referência, entre eles uma abordagem de um método específico em um estudo interlaboratorial, realizado em diferentes laboratórios. Esse procedimento pressupõe a existência de alguns laboratórios igualmente capazes, empregando métodos que foram validados independentemente e implica que as diferenças entre os resultados individuais são de natureza estatística e podem, portanto, ser tratadas através de procedimentos puramente estatísticos [70]. A caracterização através da comparação interlaboratorial é o método mais utilizado na maioria dos trabalhos publicados [1, 8, 83, 90].

Assim sendo, a certificação consiste em uma atribuição de dados de concentração que seja tão próximo quanto possível do “valor verdadeiro”, que quando associado ao limite de incerteza torna-se um dos desafios do desenvolvimento de um MR [20]. Além disso, o essencial, particularmente para todos os MRC, é que o certificado contenha uma declaração de rastreabilidade que indique os princípios e procedimentos em que se baseiam os valores de propriedade (incluindo as incertezas de medição) [70].

Nesse sentido, os valores atribuídos em um programa interlaboratorial são a melhor estimativa possível do valor real para os analitos de interesse em uma amostra teste. Embora os valores de propriedade que são calculados usando os resultados analíticos dos participantes, possam ser usados como valores atribuídos, podem ser influenciados pelo método analítico e /ou pelo desempenho dos participantes [95]. Logo, em função das diversas influências que são passíveis de ocorrer não só durante um programa interlaboratorial, mas em todas as etapas do desenvolvimento de um novo MR, é necessário que o valor de propriedade seja acompanhado do seu respectivo valor de incerteza.

### 2.7.1.1. Testes estatísticos para identificação e exclusão de valores anômalos

Conforme recomendações da ISO GUIA 35, todos os resultados fornecidos pelos laboratórios participantes no estudo para obtenção dos valores de propriedades devem ser verificados quanto à evidência de erros técnicos com base nas informações sobre os procedimentos de medição fornecidos pelos participantes do estudo. Nesse sentido, métodos estatísticos apropriados para o conjunto de dados devem ser selecionados para identificar evidências de possíveis discrepâncias entre grupos (principalmente diferenças entre métodos e laboratórios) [3].

Em relação ao estudo colaborativo, existem algumas razões técnicas para a obtenção de valores dispersos, tais como: calibração e procedimentos de medição inadequados, problemas com reagente, falha em contabilizar interferências e desvio do valor certificado de um material de controle de qualidade independente [3]. A ISO 13528 sugere os testes de Grubbs e Cochran para avaliação e identificação de valores dispersos em estudo interlaboratoriais [72]. Outros testes estatísticos como os de Chauvenet e Dixon também são citados na literatura [20, 26]. Em alguns trabalhos publicados, os testes de Grubbs e Cochran são aqueles que são utilizados com maior frequência [1, 8, 83, 90].

O teste de Grubbs é frequentemente usado para identificação e remoção de possíveis outliers na população dos resultados individuais de cada laboratório [96, 97]. O valor calculado de Grubbs, “G”, é obtido através da Equação (8).

$$G = \frac{|x_i - \bar{x}|}{s} \quad \text{Equação (8)}$$

( $x_i$ ) é o resultado do participante e ( $\bar{x}$ ) é a média de todos os resultados em relação ao desvio padrão ( $s$ ). Se o valor de “G” é maior que o valor crítico correspondente a valores tabelados o valor suspeito é considerado como *outlier* a um nível de significância de 95%.

O teste de Cochran é empregado para identificar outliers na variância dos laboratórios[1, 97], compara a maior variância com as demais e pode ser calculado por meio da Equação (9).

$$C = \frac{s_{máx}^2}{\sum_{i=1}^p s_i^2} \quad \text{Equação (9)}$$

em que: “ $C$ ” é o valor calculado de Cochran;  $p$  é o número total de variância;  $s^2_i$  = variância;  $s^2_{máx}$  é a maior variância entre os resultados. Os resultados calculados são comparados com os valores críticos a um nível de significância de 95%.

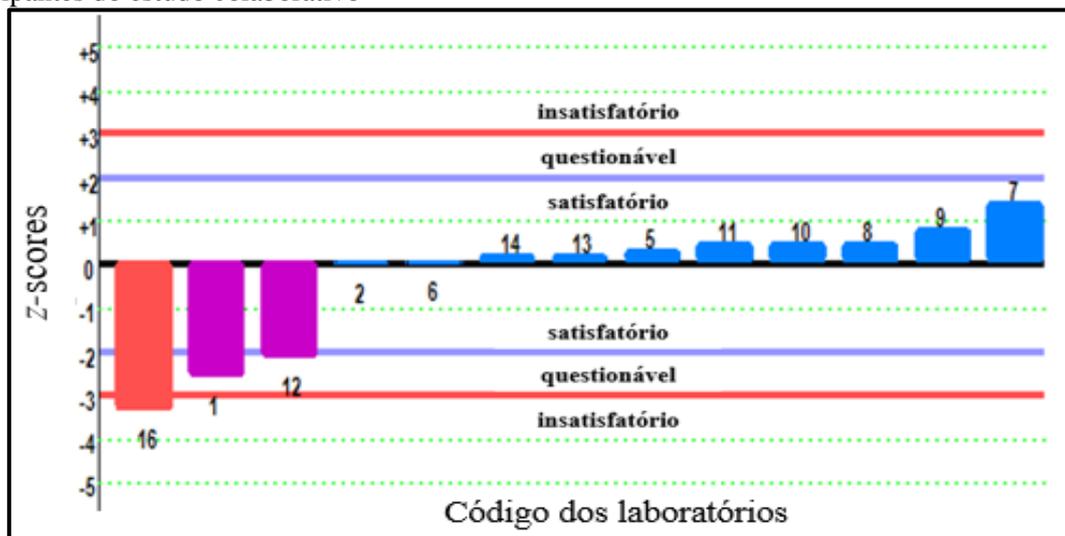
A compatibilidade entre os resultados de cada laboratório pode ser avaliada com base nos valores atribuídos para cada elemento e no valor medido pelos participantes através do cálculo de z-scores robusto, que é um método simples de fornecer um índice de desempenho normalizado para cada participante e depende de sua interpretação, mostrando como satisfatório, questionável ou insatisfatório [97, 98]. Assim, o índice de desempenho é obtido e pode ser calculado como sendo  $z=(x_i - md)/IQN$ , em que  $x_i$  é o resultado obtido pelo laboratório  $i$ ;  $md$  é o valor da mediana dos resultados do grupo para o parâmetro e  $IQN$  é a amplitude interquartílica normalizada dos resultados do grupo para o parâmetro [99].

A amplitude interquartílica normalizada ( $IQN$ ), medida de dispersão equivalente ao desvio padrão da estatística clássica, foi calculada através da Equação (10).

$$IQN = 0,7413 (Q_3 - Q_1) \quad \text{Equação (10)}$$

em que:  $Q_1$  (primeiro quartil) é o valor que está situado de tal modo no conjunto de dados, que uma quarta parte (25%) dos dados é menor e as três quartas partes restantes (75%), maiores do que ele;  $Q_3$  (terceiro quartil) é o valor que está situado de tal modo no conjunto de dados, que as três quartas partes (75%) dos dados são menores e uma quarta parte (25%), maior que ele; e 0,7413 é o fator para uma distribuição normal/Gaussiana [99]. Os valores de z-scores foram interpretados da seguinte forma:  $|z| \leq 2,0$  foram considerados satisfatórios;  $2,0 < |z| < 3,0$  indica resultado questionável e  $|z| \geq 3,0$  os resultados são considerados insatisfatórios e inaceitáveis [72, 100]. A representação gráfica deste índice é mostrada na Figura 5, em que quanto mais próximo de zero for o valor de z-scores, melhor o resultado reportado.

**Figura 5** – Representação gráfica do índice z-scores para avaliar o desempenho dos laboratórios participantes do estudo colaborativo



Fonte: Autor (adaptado) (2020).

### 2.7.1.2. Modelagem através das Elipses de confiança

Alternativamente, elipse de confiança se constitui em uma ferramenta que possibilita uma avaliação simples e rápida dos dados proveniente da colaboração interlaboratorial, bem como a indicação de possíveis causas dos desvios observados [1]. O procedimento gráfico é baseado em um método simples, com a utilização de amostras diferentes (A e B), porém com valores similares da propriedade a ser avaliada, as quais são enviadas para vários laboratórios para quantificação das espécies de interesse no estudo. Os pares de resultados são usados para a construção do gráfico, que é obtido através do método de Youden [101]. Basicamente um gráfico de Youden é um gráfico de dispersão, que consiste em um sistema de coordenação que se refere a dois resultados de medição relacionados e são representados através de uma elipse de confiança. É esperado que resultados aceitáveis estejam dentro da elipse, resultados questionáveis sobre ou perto da elipse e os resultados inaceitáveis estejam fora da elipse [102].

A partir dos resultados enviados pelos laboratórios participantes do estudo interlaboratorial relativos ao par de amostras A e B, um diagrama de dispersão dos resultados é construído. Esse é elaborado em um sistema de eixos cartesianos, em que a escala do eixo X cobre a faixa de resultados referentes à amostra A e, do eixo Y, a faixa de resultados da amostra B. O diagrama é construído para cada uma das propriedades e o laboratório associado ao resultado é representado por um ponto [103].

A interpretação da elipse de confiança leva em consideração os seguintes aspectos [20, 101]:

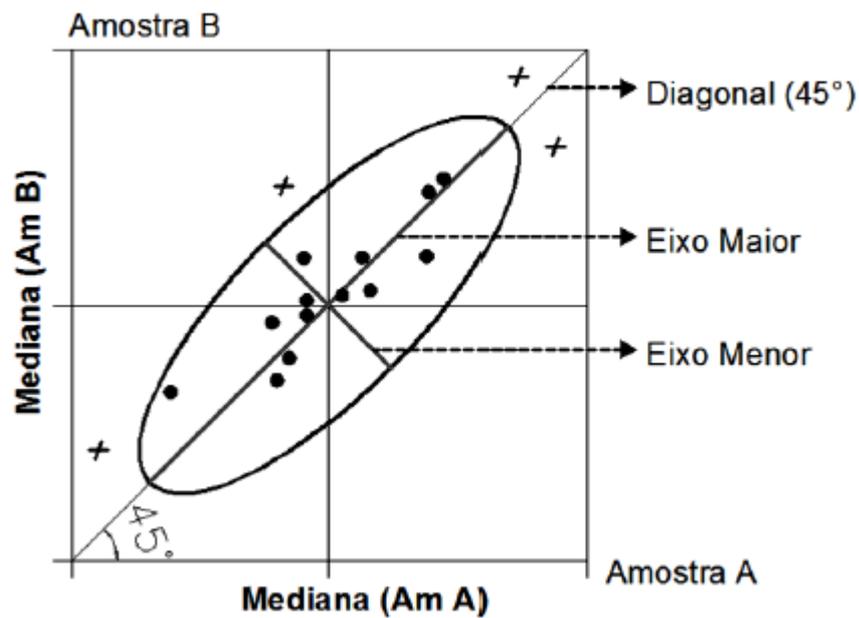
a) Pontos dentro dos limites de 5% de significância (95% de confiança) da elipse de confiança representam laboratórios que obtiveram resultados satisfatórios, o que indica que os resultados apresentaram um bom nível de exatidão e repetitividade;

b) Pontos entre os limites de 5% e 1% de significância (95% e 99% de confiança, respectivamente) representam laboratórios que obtiveram resultados suspeitos. Esses laboratórios devem rastrear seus processos de medidas para averiguar desvios de procedimento e observar seus resultados em participações futuras nos ensaios de proficiência;

c) Pontos fora dos limites de 1% de significância representam laboratórios que obtiveram resultados insatisfatórios. Verifica-se se o ponto representativo do laboratório está muito separado do resto dos dados. Se o laboratório não está seguindo o método de análise corretamente, seus resultados estarão sujeitos a erros sistemáticos e/ou aleatórios, e o ponto obtido estará afastado da linha de  $45^\circ$  da elipse. Pontos afastados da linha de  $45^\circ$  representam participantes cuja repetitividade precisa ser melhorada. Pontos localizados no alto do 1º quadrante direito ou na extremidade inferior do 3º quadrante esquerdo refletem uma tendência a obter, respectivamente, resultados mais altos ou resultados mais baixos em ambas amostras A e B. Esses laboratórios devem tomar ações corretivas para adequar seus procedimentos de medida.

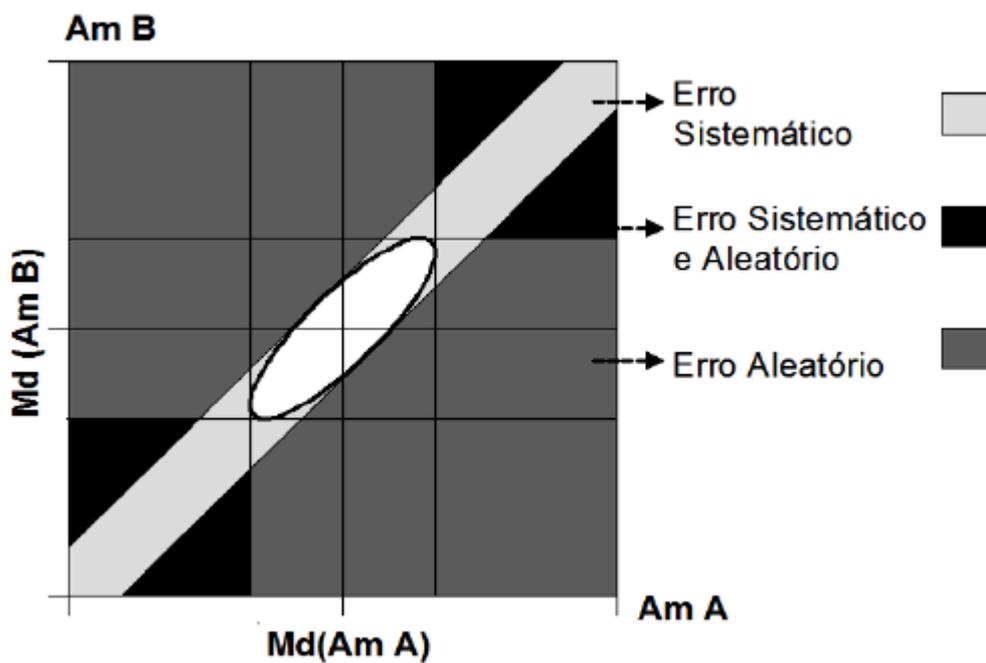
Para os pontos situados fora da elipse, afastados do eixo maior da elipse indicam erro aleatório significativo e ocorrem devido à variabilidade dentro do laboratório, podendo ter origem em operador não devidamente treinado, ou erros ocasionais (erro de leitura, erro de cálculo e conversão de valores etc.), contudo se estiverem próximos ao eixo maior da elipse indicam erros sistemáticos significativos e ocorrem devido a condições adversas do laboratório, podendo ter origem em modificações não permitidas na metodologia ou equipamentos não aferidos ou não calibrados [20], conforme Figuras 6 e 7.

Figura 6 – Modelo representativo de uma elipse de confiança



Fonte: Adaptado de Olivieri (2004, p. 17).

Figura 7 – Indicação dos tipos de erros possíveis no gráfico da elipse de confiança



Fonte: Adaptado de Fortes et al.[104] (2004, p. 7).

## 2.8. Avaliação da incerteza de um Material de Referência

Segundo o Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM), incerteza de medição é um parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um

mensurando com base nas informações utilizadas [105]. Conforme estabelece a ISO GUIA 35 [3], um dos requisitos básicos para avaliar a incerteza de um valor de propriedade de um MRC consiste em que sejam incluídos todos os fatores que podem contribuir significativamente para a incerteza associada nesse valor. Portanto, para que seja estimada a incerteza padrão combinada recomenda-se considerar as contribuições das incertezas padrão associadas a: caracterização ( $u_{char}$  – a incerteza do valor certificado, conforme obtido para o lote distribuído para cada laboratório), homogeneidade ( $u_{bb}$  – a incerteza padrão entre frascos), estabilidade a curto prazo ( $u_{sts}$ ) e estabilidade a longo prazo ( $u_{lts}$ ) [3, 8, 84, 106].

Assumindo a independência das variáveis, a incerteza associada com o valor de propriedade de um MRC pode ser expresso como [3]:

$$u_{MRC} = \sqrt{u_{char}^2 + u_{bb}^2 + u_{lts}^2 + u_{sts}^2} \quad \text{Equação (11)}$$

A GUIA EURACHEM/CITAC estabelece que, para a maioria das aplicações em química analítica, deve ser usada uma incerteza expandida, “ $U_{MRC}$ ”. A incerteza expandida fornece um intervalo dentro do qual acredita-se, com um alto nível de confiança, que esteja o valor mensurado [107]. Para se obter a incerteza expandida ( $U_{MRC}$ ), para a qual pode ser assumido que o intervalo ( $x \pm U$ ) contém uma grande fração da distribuição de valores que poderiam ser razoavelmente atribuídos à propriedade que está sendo certificada, deve-se determinar o fator de abrangência ( $k$ ) que está baseado no nível de confiança requerido [3]. Recomenda-se que esse fator de abrangência se baseie num nível de confiança igual a 95 %, no qual o valor de  $k$  é igual a 2 [1, 3, 82, 106]. Sendo assim, a incerteza padrão combinada ( $u_{MRC}$ ) será multiplicada por  $k$  para obter a incerteza expandida ( $U_{MRC}$ ), conforme Equação 12:

$$U_{MRC} = k \cdot \sqrt{u_{char}^2 + u_{bb}^2 + u_{lts}^2 + u_{sts}^2} \quad \text{Equação (12)}$$

## 2.9. A utilização da análise multivariada de dados

No ramo da química, em especial a química analítica, a aquisição de dados experimentais, especialmente com os instrumentos computadorizados, pode gerar enorme quantidade de dados altamente confiáveis em um intervalo de tempo relativamente curto [108]. Nesse cenário os sistemas multivariados nos quais pode se medir muitas variáveis

simultaneamente (ou de forma sequencial, com grande eficiência) tem ganhado bastante destaque. Nesses sistemas a conversão da resposta experimental no dado químico de interesse requer, dentre outras ferramentas, a utilização de estatística multivariada para a interpretação de dados para a aquisição do máximo de informação sobre o sistema [109].

A ISO GUIA 35 estabelece que no processo de certificação de um material de referência os estudos de homogeneidade e estabilidade sejam realizados por meio de métodos estatísticos univariados como a ANOVA [3]. No entanto, o Guia para expressão de incertezas na medição (GUM, do inglês – *Guide to the expression of uncertainty in measurement*) permite que avaliações alternativas possam ser utilizadas [85]. Nesse sentido, nos últimos anos, a análise multivariada de dados vem sendo aplicada aos dados químicos com o objetivo de avaliar diferentes tipos de resultados, permitindo que informações obscuras mostradas pelo ajuste de dados sejam observadas [20].

Dessa maneira, os métodos multivariados consideram a correlação entre muitas variáveis analisadas simultaneamente permitindo a extração de uma quantidade maior de informações, muitas vezes impossível quando se analisa variável a variável [110]. Assim, o objetivo da análise multivariada de dados é determinar todas as variações no estudo da matriz de dados que consiste em numerosas variáveis medidas a partir de um número de amostras [111].

A análise multivariada de dados pode ser dividida em três grupos [112]:

- ✓ Grupo 1: simplificação da variabilidade de dados (análise de componentes principais, análise fatorial, por correlações canônicas, por agrupamentos hierárquicos, discriminantes e de correspondência);
- ✓ Grupo 2: engloba as técnicas de interferências estatísticas (teste de hipótese, análise de variância, de covariância e regressão);
- ✓ Grupo 3: consiste em utilizar as técnicas de calibração.

Tais ferramentas quimiométricas tentam encontrar as relações entre as amostras e as variáveis em um determinado conjunto de dados e convertê-las em novas variáveis [111], as quais permitem um melhor entendimento sobre o sistema em estudo. Sem ocasionar uma perda relevante de informação, essas ferramentas estatísticas reduzem a complexidade do problema ao mesmo tempo em que evidenciam as relações entre as variáveis constituintes da base de dados [20].

Técnicas de análise exploratórias, como Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA), são utilizados para a avaliação estatística de dados, permitindo correlacionar diversas variáveis e identificar informações relevantes para a caracterização das amostras [113].

Na literatura, análise exploratória de dados já vem sendo adotada como alternativa à ANOVA durante a preparação de materiais de referência [1, 86, 87, 114, 115]. Dos Santos e colaboradores empregaram HCA para avaliar o estudo de estabilidade durante a preparação de um MR de farinha de milho. Os resultados indicam a formação de grupos compostos por temperaturas heterogêneas revelando que, independentemente da temperatura e condições de estocagem, o material é considerado estável [1]. Rocha et al. [86] compararam três procedimentos para PCA robusto dos resultados experimentais do teste de homogeneidade de um novo candidato a material de referência certificado de diclofenaco de sódio. Essa ferramenta mostrou-se bastante interessante para a identificação de outliers no conjunto de dados.

Análise de variância – análise de componentes principais (ANOVA-PCA) foram adotadas por Sarembaud et al. [87] para avaliar a estabilidade durante a preparação de MR de girassol e pão de trigo e através destas ferramentas foi possível destacar a influência da temperatura de armazenamento sobre a estabilidade do MR de girassol. Rocha e colaboradores usaram PCA e HCA para avaliação de resultados experimentais para a certificação de dois materiais de referência farmacêuticos. Através do uso dessas ferramentas estatísticas foi possível reduzir a incerteza padrão devido à homogeneidade entre frascos ( $u_{bb}$ ) e, conseqüentemente, a incerteza padrão combinada do MRC ( $u_{MRC}$ ) com nível de confiança de 95% [114].

### **2.9.1.1. Análise de Componentes Principais - PCA**

A análise de componentes principais é uma técnica que consiste na redução da dimensionalidade do conjunto de dados originais, quando existe certa correlação entre eles, preservando a maior quantidade de informação (variância) possível [20, 38]. Em outras palavras, as n-variáveis originais geram, através de suas combinações lineares, n-componentes principais (PC), cuja principal característica, além da ortogonalidade, é a ordem decrescente

de máxima variância, ou seja, a componente principal (PC 1) detém mais informações estatísticas que as demais [116].

Em uma análise de componentes principais, o agrupamento das amostras define a estrutura dos dados pela construção de gráficos de *scores* e *pesos*, cujos eixos são componentes principais (PC) nos quais os dados são projetados [117, 118]. As (PC) são as variáveis não correlacionadas, adquiridas multiplicando-se as variáveis correlacionadas originalmente com os autovetores (*pesos*). Os autovalores das PC são as medidas das discrepâncias associadas à participação das variáveis originais nas PC e são determinados pelos pesos [20].

As informações relacionadas com a composição das PC em relação às amostras são apresentadas no gráfico de *scores*. Já as informações a respeito das variáveis de cada PC podem ser obtidas no gráfico de *pesos* [117].

Além disso, a PCA também pode ser usada para julgar a importância das próprias variáveis originais escolhidas, ou seja, as variáveis originais com maior peso na combinação linear dos primeiros componentes principais são as mais importantes do ponto de vista estatístico [116]. Dessa maneira, a ferramenta estatística de análise exploratória de dados é um recurso bastante interessante como alternativa à ANOVA, pois permite avaliar com detalhe a dispersão de dados obtidos a partir de um estudo de homogeneidade de um material, por exemplo.

Dos Santos e colaboradores [119] utilizaram métodos estatísticos univariados e multivariados (ANOVA e PCA, respectivamente) para avaliar a homogeneidade de um candidato a material de referência de farinha de milho. Nesse estudo foram avaliadas massas da amostra de 100 a 500 mg para quantificar a massa mínima de um MR, além da investigação da homogeneidade intra-frasco e entre frascos, sendo que os analitos considerados foram: Ca, K, Mg, P, Zn, Cu, Fe, Mn e Mo. Apesar da ANOVA indicar que não existia diferença significativa entre os resultados, não foi possível identificar o porquê da obtenção de maior desvio padrão para as massas de 100 e 200 mg. Com o auxílio da PCA foi possível verificar que Mn e Ca foram os maiores responsáveis para dispersão dos resultados nessas massas. Contribuições importantes também foram reportadas para o estudo da homogeneidade intra-frasco e entre frascos, quando a análise multivariada foi utilizada.

Marchezi e colaboradores [120] utilizaram PCA para estudar a homogeneidade entre frascos durante a preparação de um MR de petróleo bruto. O gráfico de *escores* das duas primeiras componentes principais demonstra a ausência de agrupamento entre as réplicas de cada frasco, indicando uma distribuição homogênea dos elementos quantificados. Além disso, os pesquisadores identificaram que Mg, Sr e Na foram os responsáveis pelos maiores valores positivos de *escores* tanto na PC1 quanto na PC2 e justifica a dispersão de réplicas de dois frascos analisados em relação ao eixo central.

Durante o preparo e caracterização de um MR de rim bovino Castro et al. empregaram PCA na avaliação do estudo de homogeneidade entre frascos [121]. Os resultados apresentados em gráficos de *escores* indicam que não houve tendência evidente para a formação de agrupamentos, o que indica a homogeneidade do material.

Logo, a análise multivariada tem se consolidado na elucidação de informações durante o preparo de um MR. Além da PCA, HCA também é uma ferramenta muito importante para avaliar as inter-relações entre as variáveis sendo ambas consideradas complementares, pois além de aumentar a consistência das interpretações o entendimento do conjunto de dados é facilitado [20, 117].

### **2.9.1.2. Análise de Agrupamento Hierárquico - HCA**

Da mesma forma que a PCA, HCA (Análise de Agrupamentos por Métodos Hierárquico) é classificada como um método exploratório ou não supervisionado. A HCA tem o objetivo de “agrupar as amostras em classes, baseando-se na similaridade dos participantes de uma mesma classe e nas diferenças entre os membros de classes diferentes” [117]. Na HCA a representação é projetada num gráfico bidimensional em que as amostras semelhantes, segundo as variáveis escolhidas, são agrupadas entre si. Tal representação gráfica é chamada de dendrograma. A suposição básica de sua interpretação é a seguinte: quanto menor a distância entre os pontos, maior a semelhança entre as amostras [116].

Como exemplo de distância, aquela,  $d$ , entre dois pontos no espaço  $n$ -dimensional com coordenadas  $(x_1, x_2, \dots, x_n)$  e  $(y_1, y_2, \dots, y_n)$  é frequentemente medida como distância Euclidiana, que é a distância geométrica entre dois pontos e está definida como [38]:

$$d = \sqrt{(x_1 - y_1)^2 + (x_2 - y_2)^2 + \dots + (x_n - y_n)^2} \quad \text{Equação (13)}$$

Dessa forma, quanto menor for a distância Euclidiana, maior será a similaridade dos elementos comparados na amostra. Os dendrogramas, portanto, consistem em diagramas que representam a similaridade entre pares de amostras (ou grupos de amostras numa escala que vai de um (identidade) a zero (nenhuma similaridade) [116].

Após a escolha da medida da distância ou similaridade é necessário escolher um algoritmo para fazer os agrupamentos e, assim, fornecer uma melhor representação dos dados no dendrograma. Existem vários procedimentos para efetuar esse processo. Cada um deles difere dos outros na forma na qual definem a distância de um grupo recém-formado a um determinado objeto ou aos outros grupos já criados [38]. Na literatura, alguns trabalhos que tiveram o objetivo de produzir novos MR utilizaram o método de Ward [1, 38, 114, 115].

Lima e colaboradores [115] utilizaram análise multivariada (PCA e HCA) para avaliar a homogeneidade durante a preparação de um candidato a material de referência de farinha de trigo. Nesse trabalho, HCA foi uma ferramenta estatística bastante útil como alternativa à ANOVA, pois através da similaridade dos resultados de concentração obtidos foi possível demonstrar que o material é suficientemente homogêneo e pode ser usado como um MRL.

Castro e colaboradores [121] empregaram a técnica de HCA para avaliar o estudo de homogeneidade entre frascos durante o preparo e caracterização de um MR de rim bovino. Assim, método de agrupamento de Ward e distância euclidiana foram estabelecidos para a obtenção do dendrograma da representação dos resultados. As amostras desse estudo são distribuídas em dois grupos com grandes similaridades entre elas, além de permitir afirmar que o material é homogêneo, tendo em vista que subamostras são distribuídas nos dois grupos.

Portanto, conforme os exemplos citados, a análise multivariada de dados (seja PCA ou HCA) consiste em uma ferramenta bastante útil para ser utilizada como alternativa à ANOVA nas diversas etapas do desenvolvimento de um MR, sobretudo na elucidação de informações que, conjuntamente, essas ferramentas tem a possibilidade de extrair de grandes matrizes de dados como é o caso do preparo de MR.

## **2.10. Objetivos**

### **2.11. Objetivo geral**

O presente trabalho objetiva a preparação, caracterização e avaliação de incerteza de um novo material de referência de laboratório a partir de leite em pó para determinação de Ca, Fe, K, Mg, Na, P e Zn.

### **2.12. Objetivos específicos**

- Produzir um material de referência (MR) de leite em pó para determinação de Ca, Fe, K, Mg, Na, P e Zn;
- Determinar a massa mínima necessária que possa ser representativa de todo o lote do material, através da avaliação de diferentes porções;
- Realizar o estudo de homogeneidade visando a obtenção de porções intra e entre frascos do material de referência de leite em pó;
- Investigar as condições adequadas para armazenamento e transporte do material por meio de estudo de estabilidade a curto e longo prazo;
- Aplicar métodos estatísticos univariado e multivariados (ANOVA e PCA) para avaliar a homogeneidade e estabilidade do material de referência de leite em pó;
- Empregar a técnica de HCA para avaliar os estudos de homogeneidade e estabilidade durante a preparação do material de referência de leite em pó;
- Caracterizar o MR através de um estudo interlaboratorial com a participação de laboratórios nacionais e internacionais;
- Investigar a contribuição da incerteza das diversas etapas durante o preparo do material de referência de leite em pó;
- Utilizar a técnica de elipse de confiança para avaliar o estudo interlaboratorial.

### **2.13. Procedimento experimental**

### **2.14. Reagentes, soluções e amostras**

Todas as soluções usadas foram preparadas usando água de alta pureza com resistividade de 18,2 M $\Omega$  cm obtida de um sistema de sistema de purificação Mili-Q da Millipore (Bedford, MA, USA). Além disso, os reagentes usados em todos os experimentos foram de grau analítico, sendo ácido nítrico 65% (m/m) e peróxido de hidrogênio 30% (v/v)

ambos da marca Merck (Darmstadt, Germany). Soluções de calibração de metais disponíveis comercialmente (Titrisol, Merck) contendo 1000 mg L<sup>-1</sup> foram usadas para preparar soluções de trabalho através de diluições apropriadas. Todas as vidrarias foram mantidas em solução de ácido nítrico 10% (v/v) por um período mínimo de 24 h, lavadas com água deionizada e secas em ambiente livre de poeira, antes do uso.

### **2.15. Preparação do candidato a material de referência**

As amostras de leite em pó utilizadas neste trabalho são provenientes de um mesmo fabricante, porém de lotes diferentes, e foram adquiridas em um supermercado na cidade de Salvador, Bahia, Brasil, em dezembro de 2017. Desta forma, 6 quilogramas de leite em pó foram inicialmente homogeneizadas em caixa de polietileno e, após homogeneização, todo o conteúdo foi subdividido em 120 frascos de polietileno contendo aproximadamente 50 g em cada frasco, que receberam numeração sequencial de 1 a 120, resultando num total de 12 lotes. Todos os recipientes foram previamente descontaminados em solução de ácido nítrico 10% (v/v) por um período mínimo de 24 h, lavadas com água deionizada e secas em ambiente livre de poeira, antes do uso.

Com objetivo de promover descontaminação das amostras visando evitar a proliferação de micro-organismos, bactérias e fungos, todo o material foi irradiado com dose de 15 K Gy de radiação alfa proveniente do isótopo de <sup>60</sup>Co no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), em São Paulo, Brasil.

### **2.16. Instrumentação**

A determinação multi-elementar de Ca, Fe, K, Mg, P, Na e Zn foi realizada usando o seguinte equipamento: espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) – ICPE-9820, Shimadzu (Japão), equipado com um nebulizador concêntrico (taxa de fluxo de 2 mL min<sup>-1</sup>) acoplado com uma câmara de nebulização, mini tocha um detector de dispositivo de carga acoplado, instalado no laboratório do Centro Interdisciplinar de Energia e Ambiente (CIENAM) da Universidade Federal da Bahia, campus de Ondina, Salvador - Bahia. Todas as determinações foram realizadas de acordo com as seguintes condições de medição: potência de radiofrequência de 1,10 kW, fluxo de gás do plasma de 10,0 L min<sup>-1</sup>, fluxo de gás auxiliar de 0,60 L min<sup>-1</sup> e um fluxo de gás carreador de 0,70 L min<sup>-1</sup>. O tempo de exposição foi de 20 segundos e a visão na direção axial. Os elementos quantificados e as respectivas linhas analíticas foram: Ca I (220,861), Fe II (238,204), K I (797,395), Mg I

(383,826), Na I (330,232), P I (177,499) e Zn I (213,856), em que “I” é a linha de emissão atômica e “II” é a linha de emissão iônica. Argônio com pureza de 99,996% (White Martins, São Paulo, Brasil) foi usado nas medidas analíticas. A mineralização das amostras de leite em pó foi realizada usando um forno micro-ondas modelo ETHOS EZ da Milestone (Sorile, Itália).

### 2.17. Procedimento para digestão das amostras de leite em pó

Amostras de leite de 0,25 g foram pesadas em frascos de micro-ondas. Posteriormente, foram adicionados 2,0 mL de ácido nítrico a 65% (m/m), 1,0 mL de peróxido de hidrogênio a 30% (v/v) e 5,0 mL de água ultrapura. Finalmente, os frascos foram convenientemente fechados e, em seguida, submetidos ao programa de aquecimento, conforme mostrado na Tabela 2. Após a etapa de resfriamento, os frascos foram abertos e as soluções digeridas foram diluídas quantitativamente em tubos falcon até um volume final de 12,0 mL, usando água ultrapura. Os brancos analíticos foram preparados de maneira semelhante. Esse procedimento foi realizado em triplicata para todas as amostras.

**Tabela 2** - Programa de aquecimento adotado para a digestão de amostra de leite em micro-ondas

<b>Etapa</b>	<b>Potência (W)</b>	<b>Tempo (min)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>P (bar)</b>
1	600	5	80	45
2	600	2	80	45
3	800	4	120	45
4	800	2	120	45
5	1000	10	180	45
6	1000	2	180	45
7	1000	5	200	45
8	1000	10	200	45
Ventilação	-	20	-	-

Fonte: Autor (2020).

### 2.18. Características analíticas do método proposto

Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram obtidos de acordo com as recomendações da IUPAC [19]. A precisão foi expressa como desvio padrão relativo (RSD%, n=10). A exatidão do método foi avaliada através da análise de um material de referência certificado (CRM), tecido de peixe (MA-B-3/TM) fornecido da Agência Internacional de

Energia Atômica (IAEA, do inglês International Atomic Energy Agency – Áustria) e testes de adição/recuperação.

## **2.19. Estudo de homogeneidade**

No estudo de homogeneidade a escolha do frasco ocorreu de forma aleatória com o objetivo de se obter amostras representativas de todo o lote do material. Dessa forma, treze frascos do candidato a material de referência foram escolhidos aleatoriamente para este estudo e os testes foram realizados conforme as seguintes etapas:

- (1) Para o estudo da massa mínima, porções de 100, 200, 250 e 300 mg de um mesmo frasco foram investigadas [83, 119].
- (2) Após estudo anterior, o estudo de homogeneidade entre frascos foi investigado através da quantificação de analitos de interesse em onze frascos distintos do candidato a material de referência.
- (3) No estudo da homogeneidade intra-frasco dez medidas foram realizadas em um único frasco a partir da massa encontrada no estudo 1.

Todas as medidas foram realizadas em triplicata e em condições de repetitividade para a determinação da concentração de Ca, Fe, K, Mg, P, Na e Zn. Esses elementos foram escolhidos não só porque desempenham alguma função essencial no organismo humano, mas também em virtude do grande consumo de leite e seus derivados, o que requer o monitoramento constante dessas matrizes.

### **2.19.1.1. Incerteza associada à homogeneidade**

Dentre as etapas para produção de um MR, o estudo de homogeneidade é uma etapa crucial [122]. De acordo com as recomendações da ISO Guia 35 [3], a incerteza devido à falta de homogeneidade entre frascos ( $u_{bb}$ ) pode ser calculada pelas Equações (1) e (2). Quando  $MS_{inter}$  é maior do que  $MS_{intra}$ , ambas as equações são aplicadas e o maior valor  $u_{bb}$  é escolhido. Por outro lado, se  $MS_{inter}$  é menor do que  $MS_{intra}$ , o que indica pobre repetitividade do método de medição, apenas a Equação (2) pode ser usada.

## 2.20. Estudo de estabilidade

Para este estudo, 21 frascos do lote do material foram escolhidos de forma aleatória e esses foram separados em três grupos de 7 frascos, sendo que cada grupo foram armazenados nas temperaturas de -10 °C, 25 °C e 40 °C para posterior quantificação dos analitos de interesse no prazo de 1, 5, 8, 11, 14, 17 e 20 meses. Todas as análises foram realizadas em triplicata, conforme procedimento de digestão descrito no item 2.17.

### 2.20.1.1. Incerteza associada à estabilidade

O período de estudo associado com outros fatores (operador, calibração etc.) potencialmente influencia na incerteza da medição [92]. Para a produção do novo MR de leite em pó os analitos de interesse foram monitorados em 1, 5, 8, 11, 14, 17 e 20 meses, nas temperaturas de -10 °C, 25 °C e 40 °C. De acordo com a ISO Guia 35, na ausência de tendência, regressão linear (modelo linear univariado) é adequada para avaliar a estabilidade. Assim, o elemento é estável se a inclinação da reta,  $|b_1|$ , for menor que o produto entre o  $t$  de Student e o desvio padrão da inclinação em  $b_1$ ,  $s(b_1)$ . Portanto, Ca, Fe, K, Mg, Na, P e Zn foram avaliados em triplicata nos tempos e temperaturas descritos acima.

A estabilidade do material foi estimada também através da variação relativa ( $R_t$ ), conforme à seguinte razão descrita na Equação (14):

$$R_t(T) = w_t(T) / w_t(T_{ref}) \quad \text{Equação (14)}$$

em que  $w_t(T)$  corresponde a fração média da massa medida de um dado elemento quando o material foi armazenado em uma temperatura  $T$  para um período de tempo  $t$ , e  $w_t(T_{ref})$  é o valor correspondente do material estocado a uma temperatura de referência escolhida ( $T_{ref}$ ) [1, 91]. A temperatura de referência é a menor temperatura considerada [27, 88]. A incerteza associada ao estudo de estabilidade ( $U_T$ ) foi obtida a partir do desvio padrão relativo de cada temperatura no período de tempo estudado, de acordo com a Equação (15):

$$U_T = (s_{rel,t}^2(T) + (s_{rel,t}^2(T_{ref}))^{1/2} R_t(T) \quad \text{Equação (15)}$$

Para que o material seja considerado estável nas condições estudadas a razão  $R_t$  deve ser igual a 1. Entretanto, na prática, existem variações randômicas associadas ao processo de

medição [27, 91]. Dessa forma, a estabilidade é então considerada garantida se  $R_t \pm U_T$  não é significativamente diferente de 1 [91].

## **2.21. Caracterização do candidato a material de referência**

As comparações interlaboratoriais são amplamente utilizadas para diversos fins e seu uso tem aumentado internacionalmente. Dentre os objetivos das comparações interlaboratoriais está a atribuição de valor de propriedade para um MR [100]. Dessa forma, a caracterização do material foi realizada através de estudo interlaboratorial com 16 pesquisadores de 15 diferentes laboratórios, sendo um internacional, conforme Tabela 22 – Apêndice A.

Neste estudo, cada laboratório recebeu dois frascos, escolhidos de forma aleatória, bem como uma carta de recomendação com instruções básicas para a quantificação de Ca, Fe, K, Mg, Na, P e Zn, em triplicata para cada amostra. Os laboratórios seguiram os procedimentos mais adequados para garantir a rastreabilidade dos resultados. Após recepção de todos os resultados, para cada analito foi aplicado o teste de Grubbs a 95 % de confiança para identificação e remoção de possíveis outliers na população dos resultados individuais de cada laboratório [1, 83, 96], calculado de acordo com a Equação (8). Após remoção dos valores anômalos, o teste de Cochran foi para identificar outliers na variância dos laboratórios [1, 97], conforme Equação (9).

Finalmente, z-scores robusto, geralmente usado em teste de proficiência para avaliar o desempenho dos participantes foi adotado investigar variações interlaboratoriais (problemas de reprodutibilidade) para cada analito e laboratório [90]. Para obter um valor que possa ser comparado a um desvio padrão, o IQR é multiplicado por um fator de 0,7413, que é baseado na distribuição normal padrão [1]. Os valores de z-scores foram interpretados da seguinte forma:  $|z| \leq 2,0$  foram considerados satisfatórios;  $2,0 < |z| < 3,0$  indica resultados questionável e  $|z| \geq 3,0$  os resultados são considerados insatisfatórios e inaceitáveis [72, 100].

### **2.21.1.1. Elipse de confiança**

Alternativamente, elipses de confiança foram obtidas para possibilitar uma avaliação simples e rápida dos dados proveniente da colaboração interlaboratorial, bem como a indicação de possíveis causas dos desvios observados [1]. De acordo com a ISO 13528, a elipse de confiança é possível quando duas amostras de material similar são analisadas e,

então, o gráfico de Youden é construído através de valores z-scores de uma amostra contra os z-scores obtidos para outra amostra [72]. Nesse sentido, o método de Youden foi empregado para a obtenção das elipses de confiança [101]. É esperado que resultados aceitáveis estejam dentro da elipse, resultados questionáveis sobre ou perto da elipse e os resultados inaceitáveis estejam fora da elipse [102]. Para confecção das elipses de confiança foi utilizado o software Labwin-PEP [123], desenvolvido para gerenciar informações de Programas de Ensaio de Proficiência (Interlaboratoriais). Esse software atende às normas ISO-17043:2010 e ISO-13528:2015.

## **2.22. Estimativa da incerteza de medição e atribuição de valor**

Os valores atribuídos em comparação interlaboratorial são a melhor estimativa possível do valor verdadeiro para um analito em uma amostra teste, apesar de resultar em uma maior incerteza, pois os resultados dos participantes podem ser influenciados pelo método analítico e/ou desempenho do participante [72, 95]. Após exclusão dos outliers, o valor de propriedade foi obtido através da média dos valores aceitos para cada elemento a partir dos dados do estudo interlaboratorial. A incerteza expandida ( $U_{RM}$ ) do valor de propriedade para Ca, Fe, K, Mg, Na, P e Zn no MR do leite em pó foi encontrada combinando as seguintes incertezas: caracterização ( $u_{char}$ ), homogeneidade entre frascos ( $u_{bb}$ ) e estabilidade a longo prazo ( $u_{lts}$ ). Para obter a incerteza combinada ( $U_{RM}$ ), foi adotado o fator de abrangência (k) com base no nível de confiança de 95% ( $k = 2$ ) [1, 3].

## **2.23. Resultados e discussão**

### **2.24. Validação do método usado para a quantificação dos elementos**

Alguns parâmetros analíticos foram avaliados para validação do método para a quantificação dos elementos através do ICP OES. Para tanto, limites de detecção e quantificação foram calculados como 3 e 10 vezes, respectivamente, o desvio padrão de dez medidas do branco dividido pela inclinação da curva de calibração, conforme Equações 16 e 17.

$$LD = \frac{3 S_{br}}{b} \quad \text{Equação (16)}$$

$$LQ = \frac{10 S_{br}}{b} \quad \text{Equação (17)}$$

Desta forma, LD e LQ obtidos considerando uma massa de amostra de 0,25 g e um volume final de solução de 12 mL foram ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ): 16,30 e 54,34 para Ca; 0,20 e 0,65 para Fe; 1,28 e 4,25 para K; 0,25 e 0,85 para Mg; 2,75 e 9,16 para Na; 5,75 e 19,18 para P e 0,08 e 0,25 para Zn, respectivamente. Esses resultados são concordantes com alguns encontrados na literatura [53, 61, 124].

A precisão foi obtida como desvio padrão relativo (RSD) para todos os elementos, empregando uma massa de amostra de 0,25 g (n=10), sendo os valores iguais a: 5,9%, 6,7%, 3,6%, 6,4%, 6,9%, 5,7% e 6,3% para Ca, Fe, K, Mg, Na, P e Zn, respectivamente. A exatidão do método foi confirmada pela análise de um Material de Referência Certificado de tecido de peixe (MA-B-3/TM), como descrito na Tabela 3. O teste *t* estatístico mostrou que os resultados obtidos pela metodologia proposta não diferenciam significativamente com os valores certificados para um nível de confiança de 95%.

**Tabela 3** - Resultados da avaliação da exatidão obtido para um Material de Referência Certificado de tecido de peixe (Fish Tissue MA-B-3/TM)

Elemento	Valor certificado	Faixa	Valor encontrado
Ca ( $\text{mg g}^{-1}$ )	3,49	3,18 – 3,60	$3,57 \pm 0,12$
Fe ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	95,4	85,3 – 107,2	$98,2 \pm 2,5$
K ( $\text{mg g}^{-1}$ )	9,32	9,00 – 10,00	$9,24 \pm 0,09$
Mg ( $\text{mg g}^{-1}$ )	1,13	1,04 – 1,20	$1,06 \pm 0,01$
Na ( $\text{mg g}^{-1}$ )	2,16	2,00 – 2,31	$2,05 \pm 0,04$
P ( $\text{mg g}^{-1}$ )	8,53	7,53 – 9,20	$8,52 \pm 0,09$
Zn ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	109,2	106,4 – 111,9	$106,7 \pm 1,1$

Fonte: Autor (2020). Resultados expressos como média  $\pm$  intervalo de confiança de 95% (n = 3).

Alternativamente, testes de adição e recuperação em três níveis de concentração foram estabelecidos para avaliar a exatidão do método proposto e os resultados são apresentados na Tabela 4. Tais resultados confirmam a exatidão do método, além de possibilitar a determinação de todos os elementos envolvidos no processo de desenvolvimento de um novo MRL.

**Tabela 4** - Resultados da avaliação da exatidão obtidos através de testes de adição/recuperação em três níveis de concentração

	<b>Concentração adicionada (mg g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concentração encontrada (mg g<sup>-1</sup>)</b>	<b>% Recuperação</b>
<b>Ca</b>	0,00	8,50	-
	2,40	10,81	<b>96,2</b>
	4,80	13,33	<b>100,6</b>
	7,20	15,66	<b>99,5</b>
<b>Fe</b>	0,00	0,09	-
	0,05	0,13	<b>87,6</b>
	0,10	0,20	<b>113,1</b>
	0,14	0,25	<b>111,2</b>
<b>K</b>	0,00	11,30	-
	4,80	15,19	<b>81,0</b>
	9,60	20,78	<b>98,7</b>
	14,40	25,77	<b>100,5</b>
<b>Mg</b>	0,00	0,77	-
	0,29	1,09	<b>112,6</b>
	0,58	1,42	<b>114,3</b>
	0,96	1,78	<b>106,0</b>
<b>Na</b>	0,00	3,39	-
	1,44	4,60	<b>84,0</b>
	2,88	6,12	<b>94,7</b>
	4,32	7,53	<b>95,7</b>
<b>P</b>	0,00	6,69	-
	2,40	9,17	<b>103,0</b>
	4,80	11,65	<b>103,3</b>
	7,20	13,88	<b>99,8</b>
<b>Zn</b>	0,00	0,03	-
	0,02	0,05	<b>99,9</b>
	0,05	0,08	<b>99,2</b>
	0,07	0,10	<b>100,5</b>

Fonte: Autor (2020).

## 2.25. Estudo de homogeneidade

### 2.25.1.1. Avaliação da massa mínima para a homogeneidade do material

Com o objetivo de avaliar a influência da massa da amostra que permite a quantificação de todos os elementos de interesse (Ca, Fe, K, Mg, Na, P e Zn) em um nível de incerteza apropriado, porções de 100, 200, 250 e 300 mg de um mesmo frasco foram utilizadas. Os resultados são apresentados na Tabela 18 – Apêndice A. Seguindo as recomendações da ISO Guia 35 [3], ANOVA foi aplicada à matriz de dados. Foi verificado que os valores de  $F_{\text{calculado}}$  estavam abaixo dos valores de  $F_{\text{crítico}}$  para todos os elementos, indicando que não existe diferença significativa entre as massas estudadas para nível de significância de 5%. Ou seja, o material é homogêneo para os intervalos de massa analisados (100-300 mg) para todos os elementos estudados. Os resultados da ANOVA para o estudo de massa mínima estão apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5** - Resultados da ANOVA para o estudo da massa mínima do candidato a MRL de leite em pó

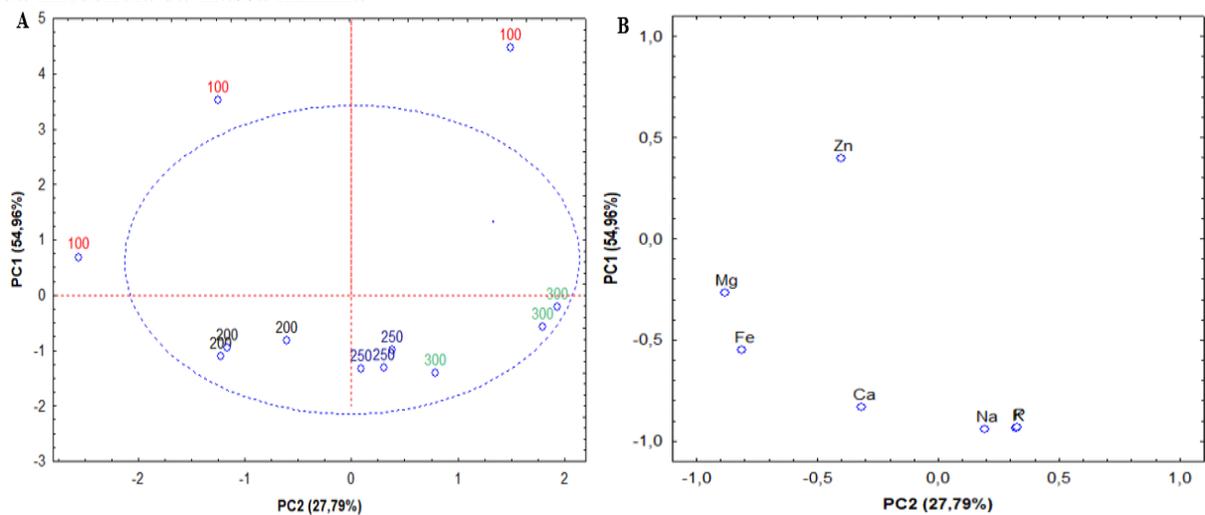
Elemento	MQ <sub>entre</sub>	MQ <sub>dentro</sub>	F <sub>cal</sub>	Valor-p
Ca	0,011	0,048	0,229	0,797
Fe	1,338 x 10 <sup>-6</sup>	6,391 x 10 <sup>-6</sup>	0,209	0,813
K	0,014	0,815	0,018	0,983
Mg	3,862 x 10 <sup>-5</sup>	3,666 x 10 <sup>-4</sup>	0,105	0,900
Na	0,002	0,013	0,128	0,881
P	0,006	0,758	0,008	0,992
Zn	1,201 x 10 <sup>-7</sup>	3,619 x 10 <sup>-6</sup>	0,033	0,967

Fonte: Autor (2020). MQ = Média Quadrática;  $F_{\text{crit}} = 3,403$ .

De forma alternativa, PCA foi empregada para a avaliação do conjunto de dados provenientes do teste da massa mínima. Após auto-escalamento dos dados usando a triplicata das concentrações, uma matriz de dados de 12 x 7 (amostras e variáveis) foi gerada. A partir dos pesos das variáveis originais das duas primeiras componentes principais, vetores ortogonais PC1 x PC2, foi estabelecido que: PC1 representa 54,96% da variância total e é dada pela expressão  $PC1 = - 0,8316 \text{ Ca} - 0,5518 \text{ Fe} - 0,9346 \text{ K} - 0,2672 \text{ Mg} - 0,9405 \text{ Na} - 0,9309 \text{ P} + 0,3943 \text{ Zn}$ ; enquanto que PC2 explica 27,79% da variância total dos dados e é dada pela expressão  $PC2 = - 0,3144 \text{ Ca} - 0,8111 \text{ Fe} + 0,3217 \text{ K} - 0,8836 \text{ Mg} + 0,1935 \text{ Na} +$

0,3278 P - 0,3992 Zn. As duas primeiras componentes principais representam juntas cerca de 82,75% da variância total dos dados com autovalores de 3,847 e 1,945 para PC1 e PC2, respectivamente. De acordo com o gráfico de escores (Fig. 8A), ajustado à elipse de 95% de confiança, observa-se que as replicatas das amostras com massa de 100 mg apresentaram elevada dispersão tanto na PC1 quanto na PC2, sugerindo a formação de um grupo independente em relação às amostras de 200, 250 e 300 mg, conforme Figura 8A. Esses resultados indicam que quando utilizada a massa de 100 mg o material não pode ser considerado homogêneo. É possível verificar ainda que as massas de 200, 250 e 300 mg são homogêneas e fazem parte de um mesmo grupo, conforme elipse de 95% de confiança [125]. Entretanto, a amostra com massa de 250 mg foi a que apresentou a menor dispersão dos resultados.

**Figura 8** - Gráfico de escores (A) e pesos (B) para as duas primeiras componentes principais do estudo da influência da massa mínima



Fonte: Autor (2020).

Em relação ao gráfico de pesos (Fig. 8B), observa-se que as variáveis Ca, K, Na e P apresentaram os maiores pesos absolutos na PC1 e, conseqüentemente, contribuem de forma bastante significativa para a separação das triplicatas quando a massa de 100 mg foi usada. Na PC2, as variáveis Fe e Mg os maiores pesos negativos, sendo essas variáveis que também contribuíram para a dispersão e separação das amostras com massa 100 mg.

Através dos gráficos de escores e pesos, conforme Figura 8, as massas de 100 mg são aquelas que apresentam maiores teores de Zn e baixa concentração dos demais elementos (Mg, Fe, Ca, Na, K e P). É possível afirmar ainda que as massas de 200 mg são as que apresentam os maiores teores de Mg e Fe. Pela Tabela 18 – Apêndice A, é possível verificar que para a maioria dos elementos, quando a amostra de 250 mg foi utilizada, os resultados

apresentaram os menores desvios padrão. Os resultados das triplicatas para esta massa também apresentaram a menor dispersão, conforme apresentado no gráfico de escores, Fig. 8A. Logo, com intuito de evitar que a robustez do método fosse afetada, uma massa mínima de 250 mg foi fixada para as demais análises.

### 2.25.1.2. Estudo de homogeneidade entre e intra-frasco

Para ambos os estudos, uma massa de amostra de 250 mg do candidato a material de referência foi tomada e as análises realizadas em triplicata, sendo que a escolha dos frascos ocorreu de forma aleatória. Portanto, um único frasco (dez medidas) e onze frascos foram utilizados para os estudos de homogeneidade intra-frasco e entre frascos, respectivamente, conforme resultados apresentados nas Tabelas 19 e 20 – Apêndice A. Assim sendo, os dados desses estudos foram avaliados de acordo com a comparação das variâncias obtidas pela ANOVA [3] para todos os elementos estudados (Ca, Fe, K, Mg, Na, P e Zn). De acordo com os resultados (Tabela 6), todos os valores de  $F_{\text{calculado}}$  estão menores do que  $F_{\text{crítico}}$  para um nível de significância de 5%. Os valor-p são todos abaixo de 0,05, o que reitera que não existe diferença significativa entre as variâncias obtidas, concluindo, dessa forma, que o candidato a MRL é completamente homogêneo para Ca, Fe, K, Mg, Na, P e Zn.

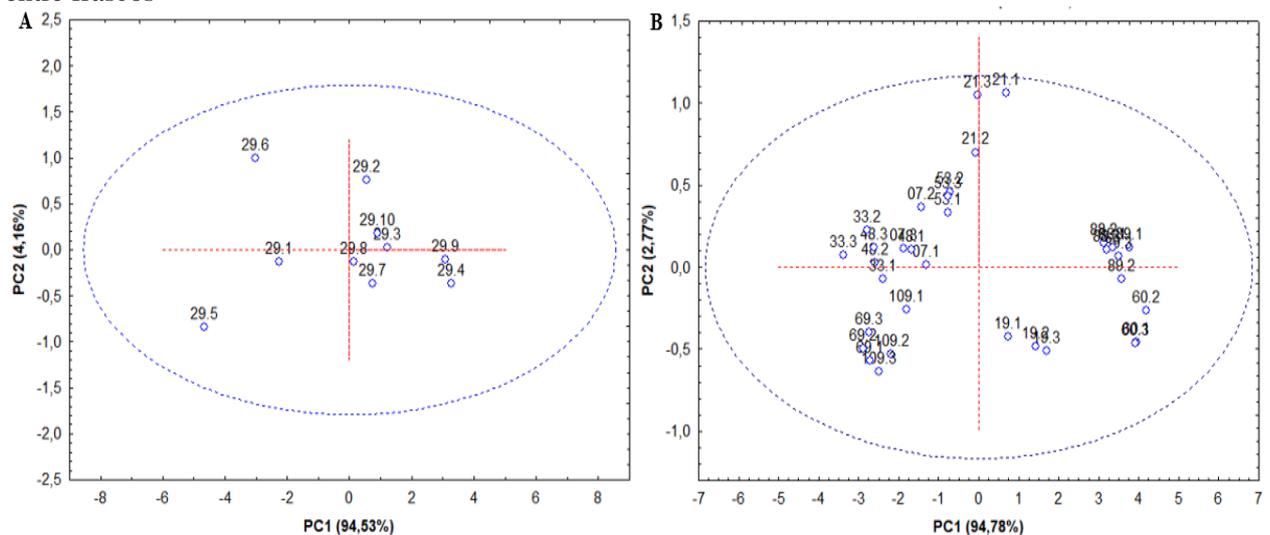
**Tabela 6** - Resultados de ANOVA para os estudos de homogeneidade intra e entre frascos<sup>(a)</sup>

Parâmetro	Ca	Fe	K	Mg	Na	P	Zn
<b>Estudo de homogeneidade intra-frasco<sup>(b)</sup></b>							
<b>MQ<sub>entre</sub></b>	1,49 x 10 <sup>-3</sup>	5,98 x 10 <sup>-7</sup>	0,03	3,11 x 10 <sup>-5</sup>	9,18 x 10 <sup>-4</sup>	3,07 x 10 <sup>-3</sup>	5,24 x 10 <sup>-8</sup>
<b>MQ<sub>dentro</sub></b>	0,10	5,77 x 10 <sup>-5</sup>	0,28	7,33 x 10 <sup>-4</sup>	0,01	0,08	2,27 x 10 <sup>-6</sup>
<b>F<sub>cal</sub></b>	0,01	0,01	0,11	0,04	0,07	0,04	0,02
<b>Valor-p</b>	0,99	0,99	0,89	0,96	0,93	0,96	0,98
<b>Estudo de homogeneidade entre frascos<sup>(c)</sup></b>							
<b>MQ<sub>entre</sub></b>	7,64 x 10 <sup>-4</sup>	3,94 x 10 <sup>-7</sup>	3,84 x 10 <sup>-3</sup>	8,81 x 10 <sup>-6</sup>	1,41 x 10 <sup>-3</sup>	3,55 x 10 <sup>-3</sup>	3,14 x 10 <sup>-8</sup>
<b>MQ<sub>dentro</sub></b>	0,07	1,50 x 10 <sup>-5</sup>	0,23	3,13 x 10 <sup>-4</sup>	0,01	0,06	8,54 x 10 <sup>-7</sup>
<b>F<sub>cal</sub></b>	0,01	0,03	0,02	0,03	0,13	0,06	0,04
<b>Valor-p</b>	0,99	0,97	0,98	0,97	0,88	0,94	0,96

Fonte: Autor (2020). <sup>(a)</sup>MQ = Média Quadrática. <sup>(b)</sup>F<sub>crit</sub> = 3,28; <sup>(c)</sup>F<sub>crit</sub> = 3,32.

A homogeneidade intra-frasco também foi avaliada através da análise multivariada de dados, utilizando PCA, conforme apresentado na Figura 9A, que representa 98,69% da variância total dos dados nas duas primeiras componentes principais com autovalores de 6,617 e 0,291 para PC1 e PC2, respectivamente. Com os dados auto-escalados, uma matriz de dados de 10 x 7 (amostras e variáveis) foi obtida. A partir dos pesos das variáveis originais das duas primeiras componentes principais, foi estabelecido que: a primeira componente principal PC1 representa 94,53% da variância total e é dada pela expressão  $PC1 = -0,9737 Ca - 0,8915 Fe - 0,9866 K - 0,9817 Mg - 0,9824 Na - 0,9977 P - 0,9884 Zn$ ; enquanto que a segunda componente principal PC2 explica 4,16% da variância total dos dados e é dada pela expressão  $PC2 = +0,1424 Ca + 0,4406 Fe - 0,1432 K - 0,1824 Mg - 0,1416 Na - 0,0462 P - 0,0262 Zn$ . É possível verificar que os resultados para cada subamostra estão distribuídos de forma totalmente aleatória, tanto na PC1 quanto na PC2, de acordo com os valores de escores, sugerindo, portanto, que todas as amostras fazem parte de um mesmo agrupamento, de acordo com elipse de 95% de confiança. Esses resultados estão bastante concordantes com aqueles obtidos pela ANOVA e confirma a homogeneidade do material para os elementos estudados. Utilizando diferentes abordagens, outros pesquisadores chegaram a resultados similares quando PCA foi empregada para avaliação da homogeneidade de candidato a MR de diferentes matrizes [115, 119].

**Figura 9** - Gráfico de escores PC2 versus PC1: (A) homogeneidade intra-frasco e (B) homogeneidade entre frascos



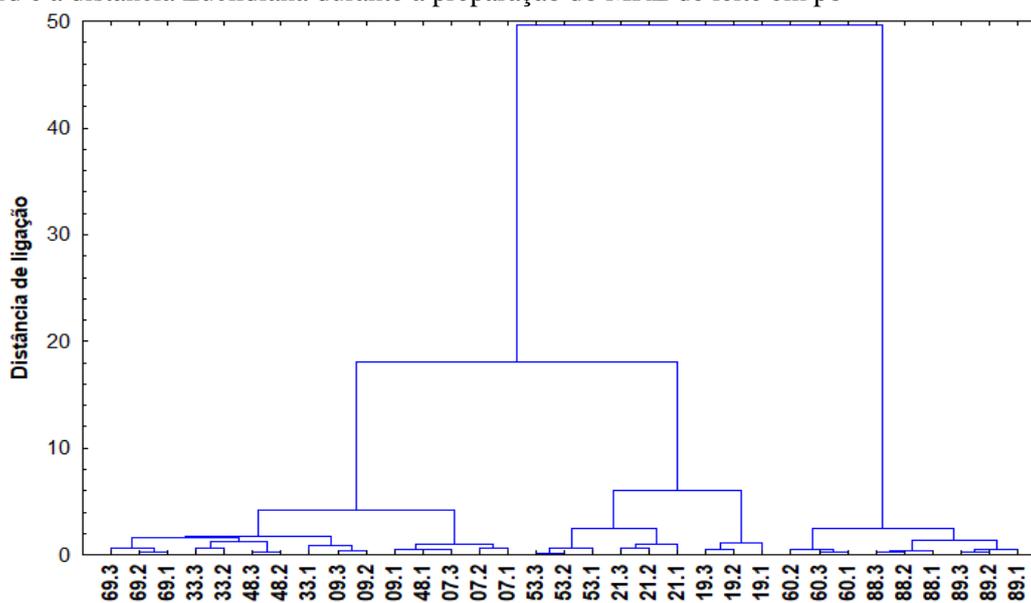
Fonte: Autor (2020).

Na avaliação da homogeneidade entre frascos, os resultados são bastantes concordantes com aqueles obtidos através da ANOVA. Após auto-escalamento dos dados usando a triplicata das concentrações, uma matriz de dados de 33 x 7 (amostras e variáveis)

foi gerada. A partir dos pesos das variáveis originais das duas primeiras componentes principais, a primeira componente principal PC1, que representa 94,78% da variância total dos dados, é dada pela expressão  $PC1 = - 0,9827 \text{ Ca} - 0,9447 \text{ Fe} - 0,9816 \text{ K} - 0,9636 \text{ Mg} - 0,9807 \text{ Na} - 0,9935 \text{ P} - 0,1932 \text{ Zn}$ ; enquanto que a segunda componente principal PC2 explica 2,77% da variância total dos dados e é dada pela expressão  $PC2 = - 0,0704 \text{ Ca} + 0,2986 \text{ Fe} - 0,1187 \text{ K} - 0,1885 \text{ Mg} - 0,0649 \text{ Na} - 0,0518 \text{ P} + 0,2072 \text{ Zn}$ . Neste estudo, as duas primeiras componentes principais são as responsáveis por descrever 97,55% da variabilidade dos dados e possuem autovalores de 6,634 e 0,194 para PC1 e PC2, respectivamente. Pelo gráfico de escores (Figura 9B) é possível que, de forma análoga ao verificado para o estudo da homogeneidade intra-frasco, cada frasco é distribuído de forma aleatória na PC1 e PC2, de forma que esses resultados sugerem a existência de um mesmo agrupamento, como observado através de elipse de 95% de confiança [125], e confirma a homogeneidade do material candidato a MRL para Ca, Fe, K, Mg, Na, P e Zn.

Análise de Agrupamento Hierárquico foi obtida usando os parâmetros da análise de componentes principais ao conjunto de dados, ao invés das variáveis originais, as próprias PC, uma vez que elas são, por definição, ortogonais entre si [108]. Dessa forma, algoritmo de agrupamento de Ward e a distância Euclidiana foram estabelecidos para avaliar a homogeneidade entre frascos, conforme apresentado na Figura 10. Uma análise detalhada desta figura, considerando a distância de ligação entre 20 e 30, verifica-se a formação de dois grupos, que também podem ser evidenciados na análise de PCA, Figura 9B. Nos dois grupos as amostras apresentam similaridades entre si e não fornecem evidências que possa indicar a heterogeneidade entre os frascos analisados, que são representativos de todo o lote preparado. Vários frascos, (33, 48 e 109, por exemplo) possuem réplicas distribuídas em mais de um subgrupo de forma aleatorizada e sem qualquer evidência para a formação de possíveis agrupamentos entre um conjunto de amostras. Assim, a Figura 10 ratifica a conclusão obtida por meio da PCA em relação a homogeneidade do material para Ca, Fe, K, Mg, Na, P e Zn.

**Figura 10** - Dendrograma para o estudo de homogeneidade entre frascos obtido através do algoritmo de Ward e a distância Euclidiana durante a preparação do MRL de leite em pó



Fonte: Autor (2020).

### 2.25.1.3. Incerteza associada à homogeneidade

No estudo de homogeneidade, os efeitos da homogeneidade intra-frasco, que estabelecem um requisito relativo à massa mínima, não são incluídos no modelo que avalia a incerteza de medição do valor da propriedade de um MR [84]. Então, a incerteza em relação a não homogeneidade entre frascos foi obtida usando as Equações (1) e (2). Os parâmetros estatísticos da ANOVA e a incerteza padrão estimada são apresentados na Tabela 7, em que o elemento que contribuiu com uma maior incerteza foi o K e Zn com a menor contribuição. Em valores absolutos, esses são os elementos que possuem, respectivamente, a maior e a menor concentração do MR, o que explica essa observação.

**Tabela 7** - Parâmetros estatísticos obtidos através de ANOVA fator único e incerteza estimada devido à falta de homogeneidade entre frascos ( $u_{bb}$ ) para a preparação do MRL de leite em pó

Elemento	Valor-p	$u_{bb}$ (mg g <sup>-1</sup> )
Ca	0,989	0,076
Fe	0,974	0,001
K	0,984	0,142
Mg	0,972	0,005
Na	0,879	0,031
P	0,943	0,072
Zn	0,964	2,711 x 10 <sup>-4</sup>

Fonte: Autor (2020).

## 2.26. Estudo de estabilidade

Existem dois tipos de estudos de estabilidade que devem ser realizados: a curto prazo, em que a amostra é submetida às condições mais extremas de temperatura visando simular condições de transporte e o estudo de estabilidade a longo prazo que tem o objetivo de simular condições de estocagem do novo MR. Nesse último estudo não é necessário que o material seja submetido às condições de temperatura muito extrema, pois o principal objetivo é investigar o material nas condições de temperatura a qual será armazenado pelo produtor [3].

O estudo de estabilidade para o candidato a material de referência de leite foi avaliado para as condições de estocagem, tendo em vista que sob essas condições a contribuição da incerteza pode ser maior. Portanto, geralmente somente a incerteza durante a etapa de estocagem é incluída na incerteza certificada [126, 127]. Dessa forma, os parâmetros provenientes da ANOVA fator único para cada elemento são apresentados na Tabela 8. Os resultados das concentrações para cada analito em cada período e condições de estocagem estão descritos na Tabela 21 – Apêndice A.

**Tabela 8** - Parâmetros provenientes da ANOVA fator único para o estudo de estabilidade durante a preparação do MRL de leite em pó

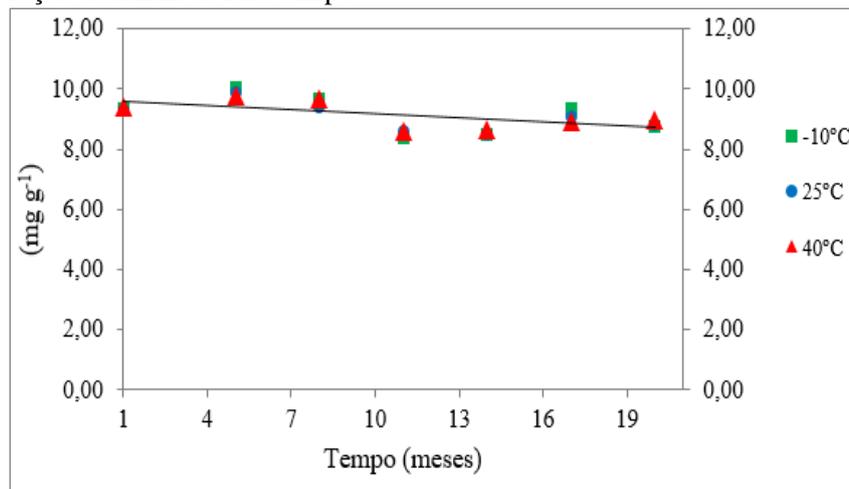
Elemento	MQ <sub>entre</sub>	MQ <sub>dentro</sub>	F <sub>cal</sub>	Valor-p
Ca	0,004	0,264	0,014	0,986
Fe	3,991 x 10 <sup>-5</sup>	8,166 x 10 <sup>-5</sup>	0,489	0,616
K	0,020	1,116	0,018	0,983
Mg	0,002	0,003	0,670	0,515
Na	0,067	0,084	0,804	0,452
P	0,127	0,475	0,267	0,767
Zn	4,535 x 10 <sup>-7</sup>	4,705 x 10 <sup>-6</sup>	0,096	0,908

Fonte: Autor (2020). MQ = Média Quadrática; F<sub>crit</sub> = 3,150.

De acordo com os dados obtidos, é possível observar que os valores de F<sub>calculado</sub> foram menores que o F<sub>crítico</sub> para um nível de significância de 5% para todos os elementos nas diferentes temperaturas e períodos de tempo avaliados. Além disso, o valor-p foram todos maiores que 0,05, confirmando que, independente das condições estabelecidas neste estudo os resultados são satisfatórios, uma vez que não há diferença significativa sendo, portanto, o material considerado estável para Ca, Fe, K, Mg, Na, P e Zn.

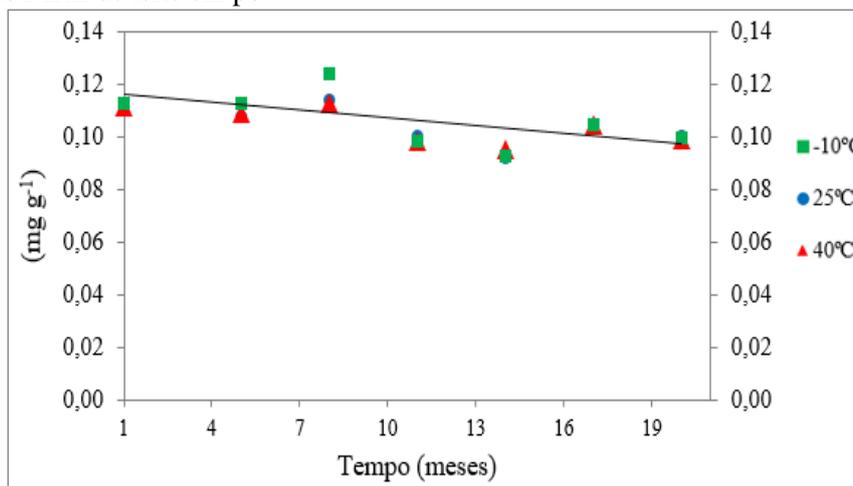
Conforme recomendação da ISO Guia 35, na ausência de tendência, a regressão linear (modelo linear univariado) é adequado para avaliar a estabilidade. Assim, parâmetros a partir da análise de regressão linear da massa de Ca, Fe, K, Mg, Na, P e Zn em função do tempo foram obtidos através das Equações (3) – (6). Nas Figuras 11 a 17 são apresentados os gráficos de regressão linear para esses elementos no período estudado para as temperaturas de -10 °C, 25 °C e 40 °C

**Figura 11** - Gráfico da análise de regressão do estudo de estabilidade a longo prazo para cálcio durante a preparação do MRL de leite em pó



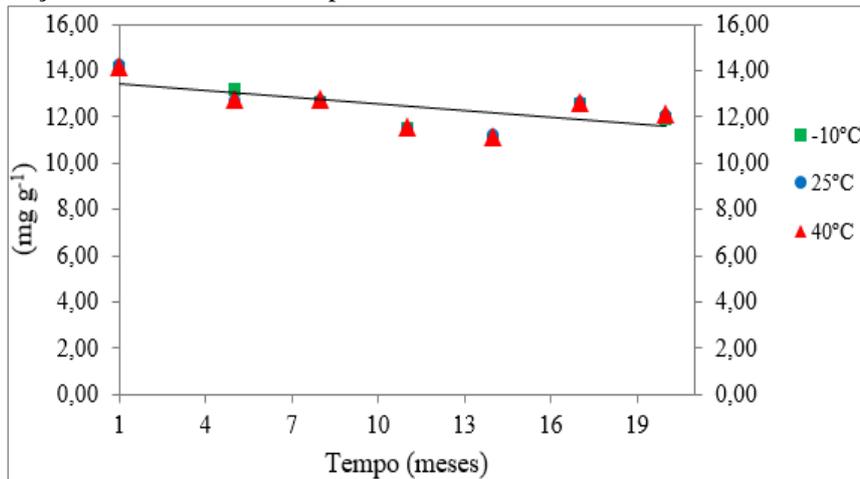
Fonte: Autor (2020).

**Figura 12** - Gráfico da análise de regressão do estudo de estabilidade a longo prazo para ferro durante a preparação do MRL de leite em pó



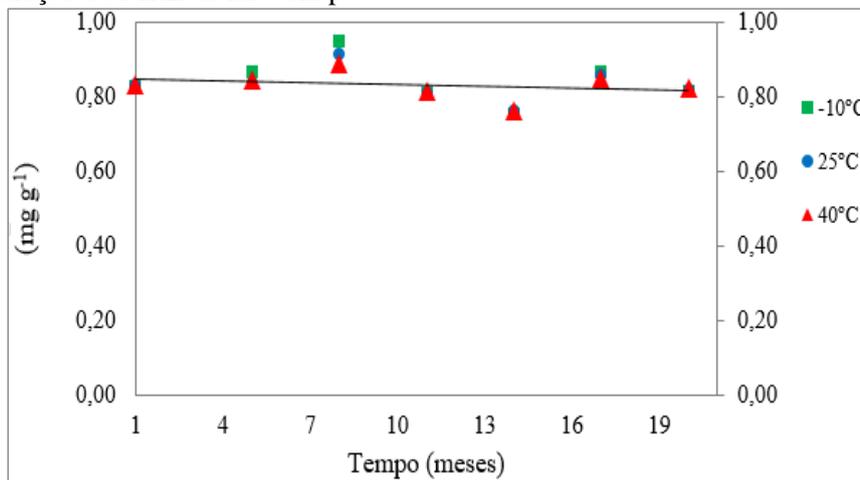
Fonte: Autor (2020).

**Figura 13** - Gráfico da análise de regressão do estudo de estabilidade a longo prazo para potássio durante a preparação do MRL de leite em pó



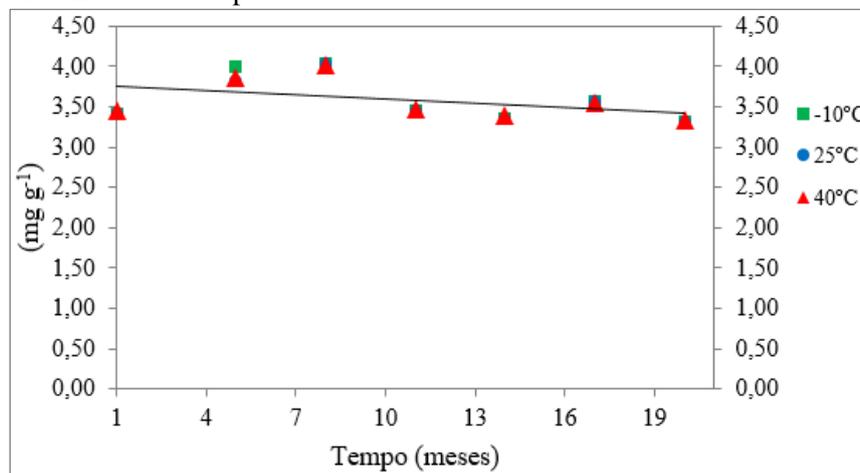
Fonte: Autor (2020).

**Figura 14** - Gráfico da análise de regressão do estudo de estabilidade a longo prazo para magnésio durante a preparação do MRL de leite em pó



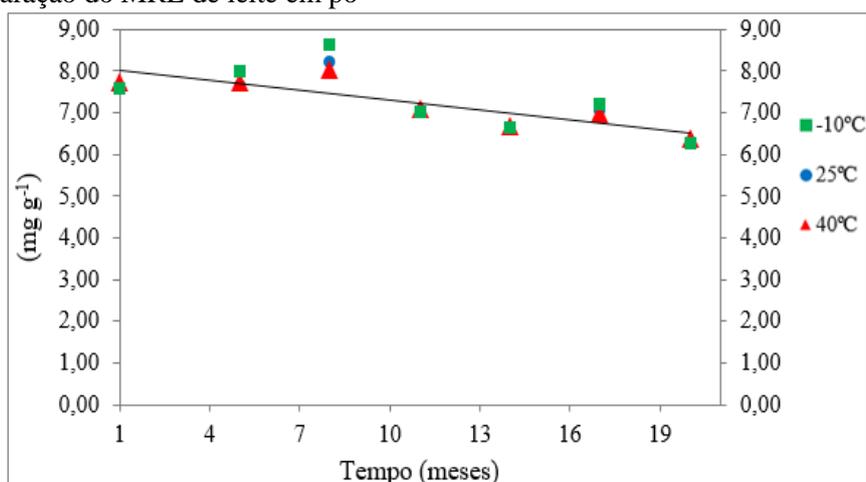
Fonte: Autor (2020).

**Figura 15** - Gráfico da análise de regressão do estudo de estabilidade a longo prazo para sódio durante a preparação do MRL de leite em pó



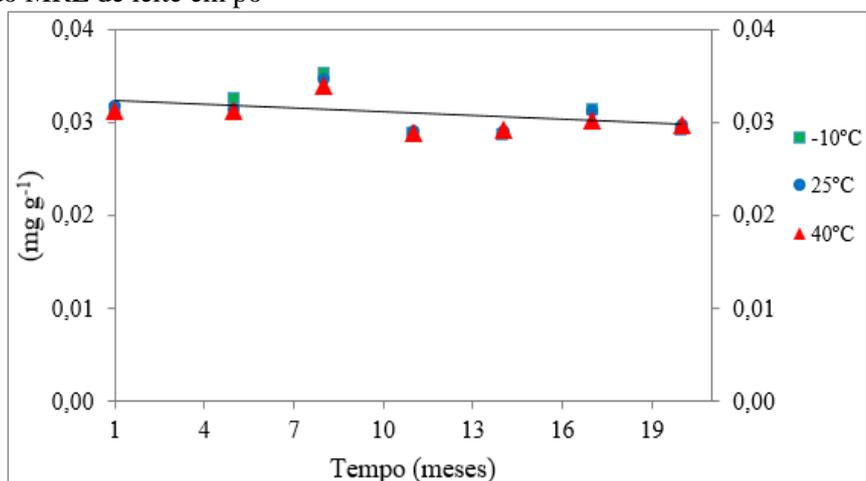
Fonte: Autor (2020).

**Figura 16** - Gráfico da análise de regressão do estudo de estabilidade a longo prazo para fósforo durante a preparação do MRL de leite em pó



Fonte: Autor (2020).

**Figura 17** - Gráfico da análise de regressão do estudo de estabilidade a longo prazo para zinco durante a preparação do MRL de leite em pó



Fonte: Autor (2020).

Pela análise dos parâmetros obtidos através das Equações (3) – (6) e apresentados na Tabela 9, o elemento é considerado estável se a inclinação da reta for menor que o produto entre o  $t$  de Student (com um número de grau de liberdade igual a  $n-2$ ) e o desvio padrão da inclinação da reta ( $s(b_1)$ ). É possível verificar que Ca, Fe, K, Mg, Na e Zn apresentaram valores de  $|b_1| < (t_{(0,95, n-2)} \cdot s(b_1))$  e, portanto, são considerados estáveis em um nível de confiança de 95%, pois não houve alterações significativas na composição desses elementos. Por outro lado, para P o valor de  $|b_1| > (t_{(0,95, n-2)} \cdot s(b_1))$  e poderia ser considerado instável em função da degradação da concentração deste elemento, conforme mostrado na Figura 16.

**Tabela 9** - Parâmetros de regressão linear associados com a estabilidade a longo prazo durante a preparação do MRL de leite em pó

Elemento	$ b_1 $	$(t_{(0,95; n=5)} \cdot s(b_1))^*$
Ca	0,047	0,072
Fe	0,0008	0,001
K	0,101	0,125
Mg	0,002	0,008
Na	0,017	0,042
P	0,079	0,074
Zn	0,047	0,072

Fonte: Autor (2020). \*  $t_{(0,95; n=5)} = 2,57$

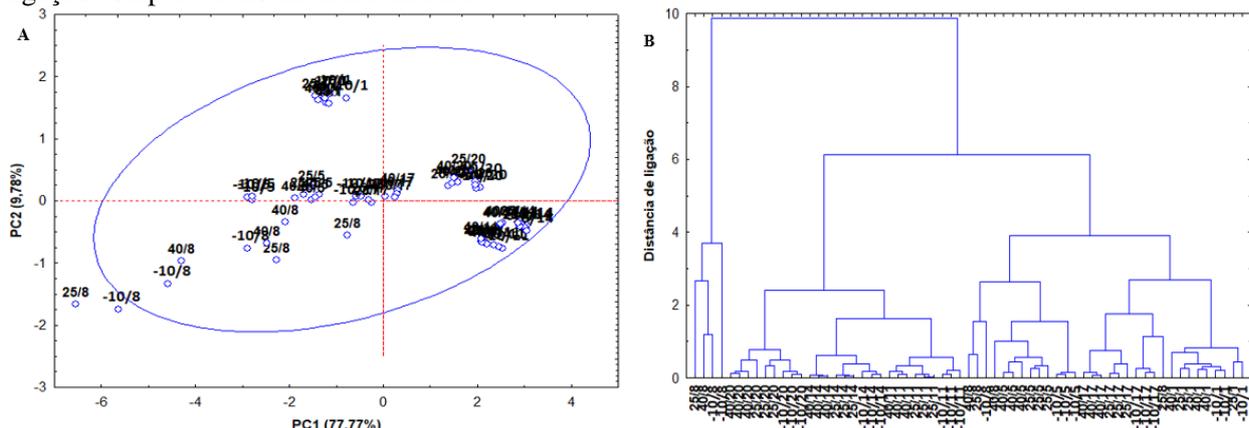
Entretanto, conforme afirmam Gandra et al.[41], a obtenção de parâmetros de regressão linear sem uma verificação prévia das premissas de regressão pode levar a conclusões errôneas sobre a estabilidade de um MR. Nesse sentido, durante a preparação de um novo material de referência para macro e micronutrientes na alimentação de peixe, Kawamoto et al. [83] encontraram valores de inclinação,  $|b_1|$ , maior que o produto entre o  $t$  de Student e o desvio padrão associado com a inclinação ( $s(b_1)$ ) para Ca, Cu, P e Zn e sugeriram que a variabilidade pode estar associada à precisão do método usando no ICP OES. Portanto, torna-se necessário que a fração em massa de P seja monitorada durante o período de armazenamento do material.

Os resultados apresentados (gráficos e parâmetros) não revelam influências significativas do período e condições de estocagem na composição dos analitos avaliados na amostra candidata a material de referência e sugere que qualquer uma das temperaturas investigada pode ser adotada para armazenar o material durante sua vida útil. Por conveniência, todo o lote contendo os frascos do material será armazenado em temperatura ambiente, aproximadamente 25 °C.

Alternativamente, Análise de Componentes Principais foi aplicada ao conjunto de dados. Após auto-escalamento dos dados das triplicatas das concentrações, uma matriz de dados de 63 x 7 (amostras e variáveis) foi obtida. De acordo com os pesos das variáveis originais das duas primeiras componentes principais, a PC1 é dada pela expressão  $PC1 = -0,3827 \text{ Ca} - 0,4051 \text{ Fe} - 0,3109 \text{ K} - 0,3740 \text{ Mg} - 0,3776 \text{ Na} - 0,3909 \text{ P} - 0,3969 \text{ Zn}$ ; enquanto que a PC2 é dada pela expressão  $PC2 = +0,2211 \text{ Ca} + 0,0735 \text{ Fe} + 0,8177 \text{ K} - 0,2995 \text{ Mg} - 0,3812 \text{ Na} - 0,1658 \text{ P} - 0,1205 \text{ Zn}$ . As duas primeiras componentes principais foram escolhidas para descriminalização dos dados, pois juntas representaram 87,55% da

variância total dos dados, sendo autovalores de 5,444 e 0,685 para PC1 e PC2, respectivamente. A partir da análise do gráfico de escores (Figura 18A), é possível afirmar que as amostras avaliadas em temperaturas e tempos diferentes estão distribuídas de forma totalmente aleatória, tanto na PC1 quanto na PC2, de acordo com os valores de escores, sugerindo, portanto, que todas as amostras fazem parte de um mesmo agrupamento. Após aplicar elipse de 95% de confiança verifica-se que uma replicata das amostras analisadas sob as temperaturas de -10 °C e 25 °C, período de estudo de 8 meses, estão fora desse do intervalo estabelecido. Tal comportamento não pode ser considerado como uma possível instabilidade do material, pois as outras duas replicatas fazem parte do mesmo agrupamento sugerido para a elipse de confiança de 95% evidenciando, assim, que erros aleatórios podem ter ocorrido. Essa mesma figura sugere ainda a formação de possíveis subagrupamentos para representar todo o conjunto de dados.

**Figura 18** – Resultados do estudo de estabilidade durante a preparação do MRL de leite em pó: (A) Gráfico de escores de PC2 *versus* PC1 e (B) dendrograma obtido usando método de agrupamento de ligação completa e distância Euclidiana



Fonte: Autor (2020).

Análise de Agrupamento Hierárquico foi obtida usando os parâmetros da análise de componentes principais ao conjunto de dados, ao invés das variáveis originais, as próprias PC, uma vez que elas são, por definição, ortogonais entre si [108] para avaliar os resultados do estudo de estabilidade a longo prazo. Assim, HCA foi estabelecida por meio do método de agrupamento de ligação completa e distância Euclidiana. Os resultados são projetados em um gráfico bidimensional, chamado dendrograma, em que quanto menor a distância de ligação entre os grupos, maior será a similaridade entre as amostras [117].

Como mostrado na Figura 18B, os resultados são separados em três grupos, considerando distância de ligação entre 4 e 6, com esses grupos apresentando amostras que

foram submetidas a temperaturas de 10 °C, 25 °C e 40 °C. É possível verificar que as distâncias de ligação refletem que as amostras são bastantes similares, o que confirma que não há diferença significativa entre as amostras e ratifica a estabilidade do MRL para Ca, Fe, K, Mg, Na, P e Zn. Uma análise mais aprofundada considerando uma distância de ligação em 2 reflete a formação de nove agrupamentos e está coerente com a observação feita através da PCA, em que replicatas das amostras analisadas sob as temperaturas de -10 °C e 25°C, período de estudo de 8 meses, são aquelas que apresentam as maiores distâncias de ligação e mostra uma dissimilaridade entre os demais grupos formados.

### 2.26.1.1. Incerteza associada à estabilidade

Os resultados obtidos durante este estudo também foram avaliados usando a variação relativa ( $R_T$ ) e sua incerteza associada ( $U_t$ ), conforme Equações (14) e (15) seguindo as recomendações da ISO Guia 35 [3]. De acordo com os dados apresentados na Tabela 10, tomando a temperatura de -10 °C como a temperatura de referência, é possível verificar que o valor de  $R_T \pm U_t$  não é estatisticamente diferente de 1 para todos os elementos nas condições estudadas. Estes resultados confirmam que o material é suficientemente estável para ser utilizado como material de referência [91]. Assim, através desses dados estatísticos, bem como dos resultados obtidos por ANOVA, PCA e HCA, fica evidente que, independentemente da temperatura e do tempo de armazenamento, a massa dos elementos de interesse para certificação (Ca, Fe, K, Mg, Na, P e Zn) não se altera.

**Tabela 10** - Resultados do estudo de estabilidade obtido durante a preparação do MRL de leite em pó após um período de estocagem de 1 a 20 meses

Elemento	Tempo (mês)	$R_t \pm U_t$ (25 °C) <sup>a</sup>	$R_t \pm U_t$ (40 °C) <sup>a</sup>	Elemento	Tempo (mês)	$R_t \pm U_t$ (25 °C) <sup>a</sup>	$R_t \pm U_t$ (40 °C) <sup>a</sup>
Ca	1	0,993 ± 0,009	1,003 ± 0,009	Na	1	1,004 ± 0,013	1,012 ± 0,012
	5	0,984 ± 0,006	0,974 ± 0,005		5	0,955 ± 0,003	0,965 ± 0,007
	8	0,976 ± 0,020	1,002 ± 0,016		8	1,001 ± 0,073	0,996 ± 0,046
	11	1,024 ± 0,003	1,024 ± 0,003		11	1,003 ± 0,002	1,009 ± 0,003
	14	0,999 ± 0,002	1,020 ± 0,002		14	1,002 ± 0,002	1,011 ± 0,003
	17	0,972 ± 0,005	0,952 ± 0,003		17	0,997 ± 0,012	0,992 ± 0,005
	20	1,011 ± 0,014	1,028 ± 0,005		20	1,001 ± 0,011	1,011 ± 0,005
Fe	1	1,002 ± 0,009	1,005 ± 0,006	P	1	1,003 ± 0,009	1,025 ± 0,027
	5	0,958 ± 0,007	0,967 ± 0,008		5	0,958 ± 0,006	0,968 ± 0,005
	8	0,921 ± 0,148	0,910 ± 0,116		8	0,952 ± 0,125	0,933 ± 0,090

	<b>11</b>	1,016 ± 0,002	1,001 ± 0,002		<b>11</b>	1,007 ± 0,002	1,013 ± 0,002
	<b>14</b>	0,995 ± 0,003	1,026 ± 0,002		<b>14</b>	0,998 ± 0,003	1,008 ± 0,003
	<b>17</b>	0,992 ± 0,005	0,995 ± 0,002		<b>17</b>	0,980 ± 0,006	0,966 ± 0,005
	<b>20</b>	1,006 ± 0,023	0,991 ± 0,004		<b>20</b>	1,000 ± 0,008	1,016 ± 0,005
	<b>1</b>	1,008 ± 0,011	1,005 ± 0,009		<b>1</b>	1,014 ± 0,009	1,000 ± 0,008
	<b>5</b>	0,966 ± 0,006	0,971 ± 0,005		<b>5</b>	0,969 ± 0,007	0,962 ± 0,009
	<b>8</b>	1,009 ± 0,053	1,014 ± 0,024		<b>8</b>	0,984 ± 0,117	0,965 ± 0,067
<b>K</b>	<b>11</b>	1,000 ± 0,007	1,009 ± 0,008	<b>Zn</b>	<b>11</b>	1,007 ± 0,002	1,000 ± 0,002
	<b>14</b>	1,015 ± 0,007	1,013 ± 0,007		<b>14</b>	1,014 ± 0,002	1,022 ± 0,002
	<b>17</b>	1,002 ± 0,005	1,003 ± 0,003		<b>17</b>	0,995 ± 0,006	0,964 ± 0,005
	<b>20</b>	1,010 ± 0,013	1,014 ± 0,006		<b>20</b>	1,022 ± 0,006	1,020 ± 0,004
	<b>1</b>	1,009 ± 0,007	1,009 ± 0,006				
	<b>5</b>	0,966 ± 0,005	0,966 ± 0,006				
	<b>8</b>	0,964 ± 0,132	0,939 ± 0,098				
<b>Mg</b>	<b>11</b>	1,000 ± 0,004	1,007 ± 0,005				
	<b>14</b>	1,008 ± 0,004	1,009 ± 0,004				
	<b>17</b>	0,994 ± 0,008	0,982 ± 0,005				
	<b>20</b>	1,003 ± 0,011	1,011 ± 0,003				

Fonte: Autor (2020). <sup>a</sup> R<sub>t</sub> = Variação Relativa; U<sub>t</sub> = Incerteza.

A incerteza associada com a estabilidade a longo prazo ( $u_{lts}$ ), mostrada na Tabela 11, foi obtida através do produto do desvio padrão da regressão ( $s_{(b1)}$ ) com o tempo de estudo (20 meses), de acordo com a Equação (7).

**Tabela 11** - Parâmetros estatísticos obtidos através de ANOVA fator único e incerteza estimada associada a estabilidade a longo prazo durante a preparação do MRL de leite em pó

Elemento	Valor-p	$u_{lts}$ (mg g <sup>-1</sup> )
Ca	0,986	0,559
Fe	0,616	0,008
K	0,983	0,975
Mg	0,515	0,062
Na	0,452	0,329
P	0,767	0,576
Zn	0,908	0,002

Fonte: Autor (2020).

## **2.27. Caracterização: o programa interlaboratorial**

Após recepção dos resultados do estudo interlaboratorial, cada laboratório recebeu um código numérico para preservar a identidade dos mesmos, conforme resultados apresentados na Tabela 23 – Apêndice A. Na realização das análises os laboratórios utilizaram, em sua maioria, etapas de mineralização das amostras com ácidos concentrados e peróxido de hidrogênio, enquanto que dois laboratórios (número 6 e 15) empregaram amostragem sólida para quantificação através das técnicas de INAA e EDXRF, conforme Tabela 12. ICP OES foi a técnica majoritária na quantificação dos analitos, porém FAAS, HR-CS FAAS e MIP OES também foram adotadas.

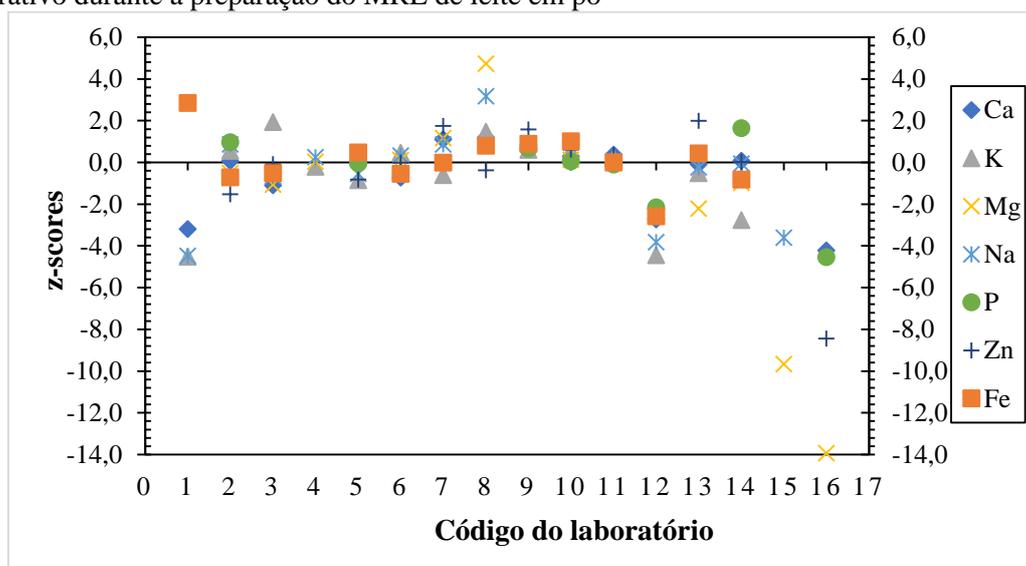
Para avaliar os resultados de cada laboratório, inicialmente, foi aplicado o teste de Grubbs, que permitiu a identificação e remoção de outliers do conjunto de dados, considerando o nível de confiança de 95% [96]. O teste de Cochran foi em seguida utilizado para avaliar as variâncias nas análises de cada laboratório [97]. Na Tabela 24 (Apêndice A) são indicados os resultados que foram excluídos através dos testes de Grubbs e Cochran. O teste z-scores possibilitou a exclusão de resultados considerados insatisfatórios, conforme critérios citados anteriormente [100]. O gráfico que representa esses resultados é mostrado na Figura 19, na qual quanto mais próximos de zero forem os valores de z-scores, melhor será o resultado relatado. Portanto, laboratórios com z-scores robustos,  $|z| \geq 3,0$  foram considerados insatisfatórios e excluídos do cálculo final para obtenção do valor de propriedade para cada analito.

**Tabela 12** - Procedimentos usados pelos laboratórios durante a comparação interlaboratorial para obtenção do valor de referência<sup>a</sup>

Código do laboratório	HNO <sub>3</sub> : H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e MO	HNO <sub>3</sub> :H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :HCl e MO	HNO <sub>3</sub> : H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> e MO	HNO <sub>3</sub> : H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e BD	Elementos Quantificados	Técnica Analítica
1				X	Ca, Fe, K, Mg, Na e Zn	FAAS
2	X				Ca, Fe, K, Mg, Na, P e Zn	ICP OES
3	X				Ca, Fe, K, Mg, Na e Zn	FAAS
4	X				K, Mg e Na	HR-CS FAAS
5	X				Ca, Fe, K, Mg, Na, P e Zn	ICP OES
6					Ca, Fe, K, Mg, Na e Zn	INAA*
7		X			Ca, Fe, K, Mg, Na e Zn	ICP OES
8			X		Ca, Fe, K, Mg, Na e Zn	MIP OES
9	X				Ca, Fe, K, Mg, Na, P e Zn	ICP OES
10	X				Ca, Fe, K, Mg, Na, P e Zn	ICP OES
11	X				Ca, Fe, K, Mg, Na, P e Zn	ICP OES
12				X	Ca, Fe, K, Na, P e Zn	ICP OES
13					Ca, Fe, K, Mg, Na e Zn	FAAS**
14	X				Ca, Fe, K, Mg, Na, P e Zn	ICP OES
15					Fe, Mg, Na e P	EDXRF*
16	X				Ca, Mg, Pb e Zn	FAAS UV-Vis <sup>b</sup>

Fonte: Autor (2020). <sup>a</sup>MO: radiação assistida por micro-ondas; BD: bloco digestor; FAAS: Espectrometria de absorção atômica com chama; ICP OES: Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado; HR-CS FAAS: espectrometria de absorção atômica de fonte contínua com alta resolução e chama; INAA: Instrumento de Análise por Ativação de Nêutrons; MIP OES: Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas; EDXRF: Fluorescência de raio X por energia dispersiva; UV-Vis: Espectrometria UV-Vis. \*Amostragem sólida; \*\* Método de digestão não reportado.

**Figura 19** – Gráfico z-scores obtido dos resultados dos laboratórios participantes do estudo colaborativo durante a preparação do MRL de leite em pó



Fonte: Autor (2020).

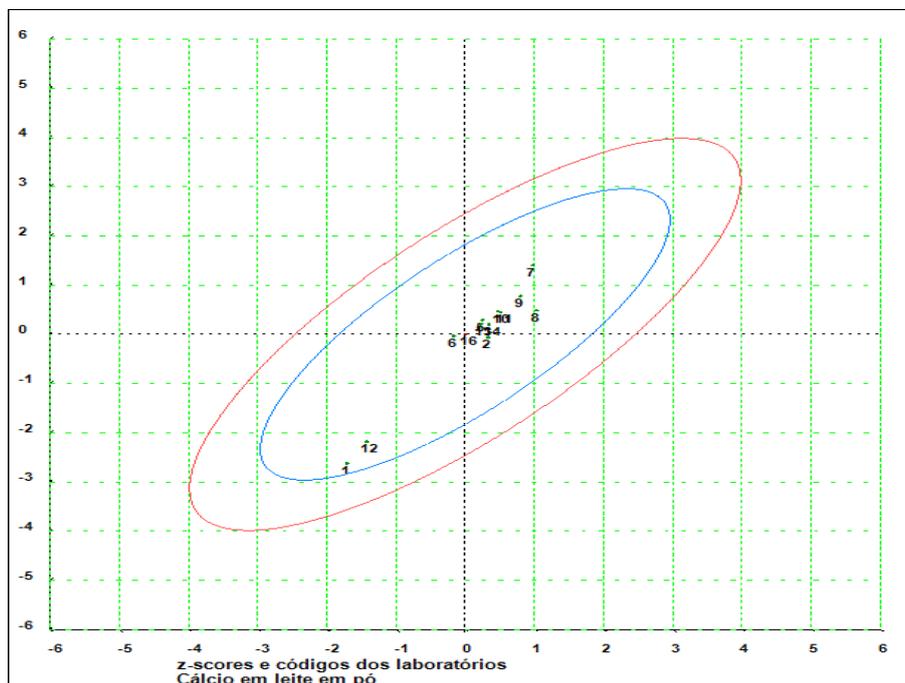
### 2.27.1.1. Elipses de confiança: avaliação da dispersão dos resultados

A compatibilidade entre os resultados apresentados pelos laboratórios foi verificada por meio de elipses de confiança, conforme método proposto por Youden [101]. Esse recurso é uma ferramenta interessante para demonstrar a correlação de resultados em diferentes itens de teste de proficiência e foi utilizado por dos Santos et al. [1] durante a caracterização de um MR de farinha de milho. Na elipse de confiança, construída a partir dos valores de z-scores, cada laboratório é representado por um ponto, cuja abscissa representa a média das medições obtidas pelo laboratório para a amostra A e a ordenada é a média das medições para a amostra B. Assim, um diagrama de dispersão dos resultados é construído em um sistema de eixos cartesianos, em que retas passam pelas médias x e y de todos os laboratórios dividindo o diagrama em quadrantes, sendo seu ponto de intersecção aceito como o valor provável [1]. Pontos encontrados no quadrante superior direito e inferior esquerdo representam laboratórios que podem estar ocorrendo erros sistemáticos e registram valores altos ou baixos em ambas as amostras do par. Os pontos afastados do eixo maior da elipse (forma um ângulo de aproximadamente 45° com o eixo x) indicam a ocorrência dispersão em função de erros aleatórios significativos.

Conforme mostrado nas Figuras 20 e 22, em que os números representam cada participante no estudo interlaboratorial, os resultados são considerados satisfatórios para todos

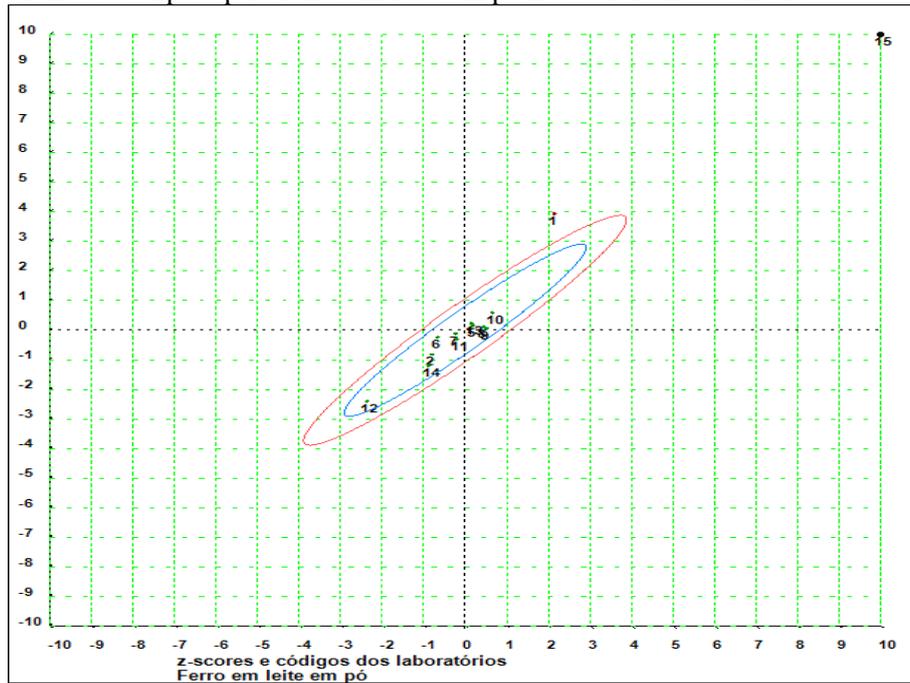
os laboratórios em relação aos elementos Ca e K, em um nível de confiança de 95%. As elipses de confiança para os demais elementos são apresentadas nas Figuras 21, 23, 24, 25 e 26. Os seguintes laboratórios tiveram desempenho considerado insatisfatório, pois apresentaram resultados fora do intervalo de 99% para os elementos: Fe para o laboratório 1, provavelmente caracterizado pela ocorrência de erros aleatórios, que podem ocorrer devido à variabilidade dentro do laboratório (operador não treinado, erro de leitura e cálculo, conversão de valores etc.); Fe para o laboratório 15, indicando a provável presença de erro sistemático devido a condições adversas do laboratório, podendo ter origem em modificações não permitidas na metodologia ou equipamentos não calibrados; Mg para os laboratórios 1 e 15, ambos provavelmente caracterizados pela ocorrência de erros sistemáticos; Na para o laboratório 8, devido a ocorrência de possíveis erros aleatórios; P para o laboratório 15 e Zn para o laboratório 1, ambos em virtude da ocorrência de prováveis erros sistemáticos. Portanto, diferentes desafios analíticos podem ocorrer durante a realização de uma análise química [128] e a indicação de erros mais específicos requer uma investigação técnica detalhada sobre cada procedimento adotado pelos laboratórios participantes do estudo.

**Figura 20** - Gráfico de elipses para cálcio em leite em pó nos dois itens de ensaio



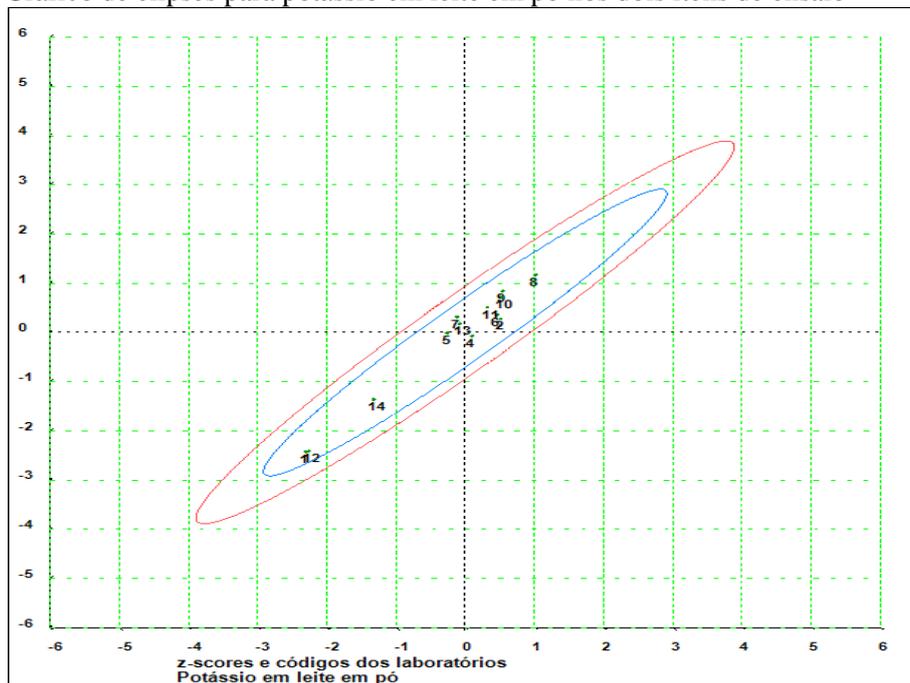
Fonte: Autor (2020).

Figura 21 - Gráfico de elipses para ferro em leite em pó nos dois itens de ensaio



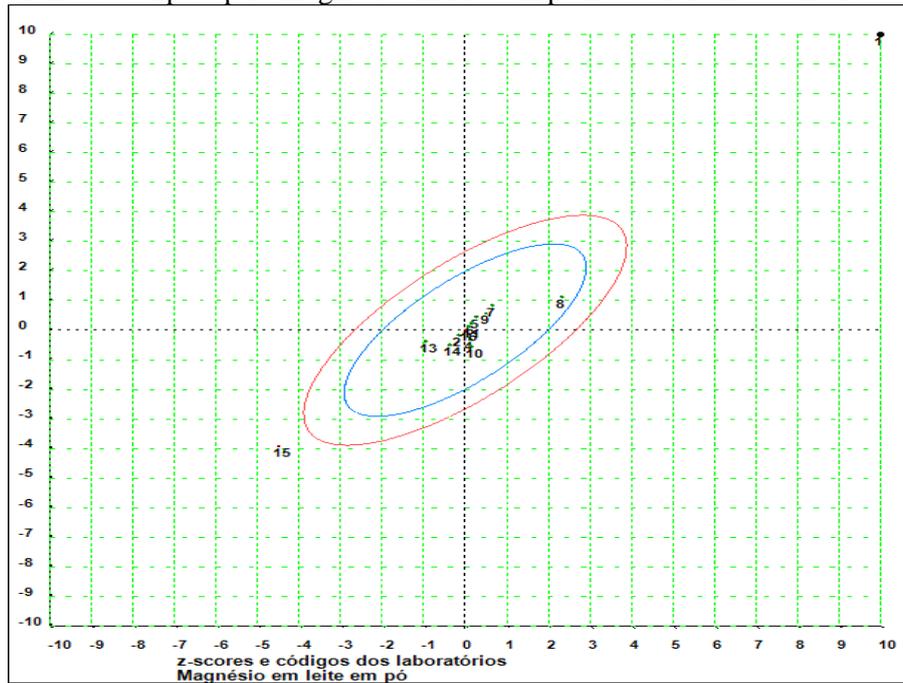
Fonte: Autor (2020).

Figura 22 - Gráfico de elipses para potássio em leite em pó nos dois itens de ensaio



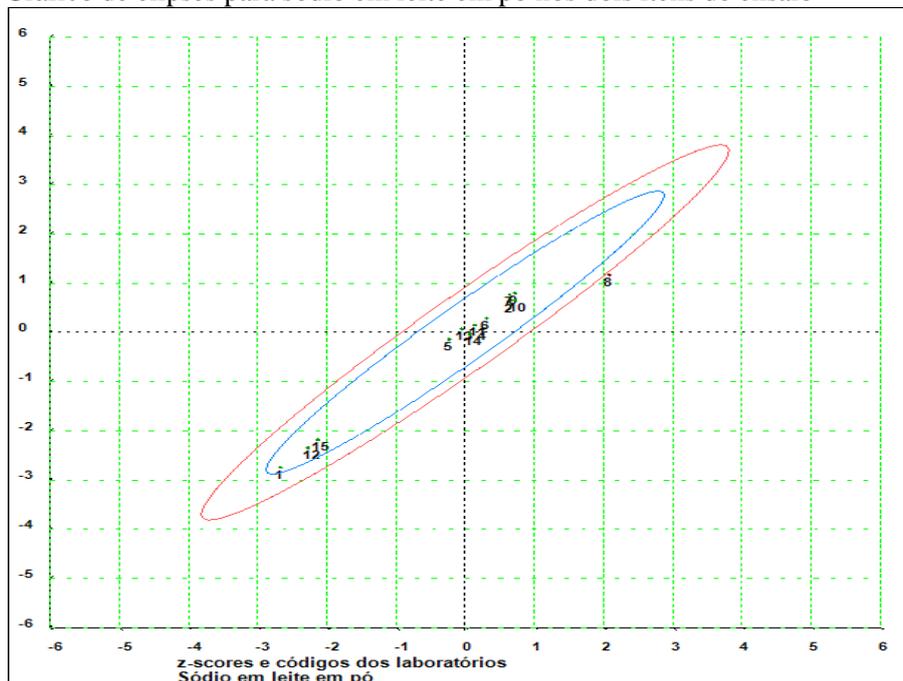
Fonte: Autor (2020).

**Figura 23** - Gráfico de elipses para magnésio em leite em pó nos dois itens de ensaio



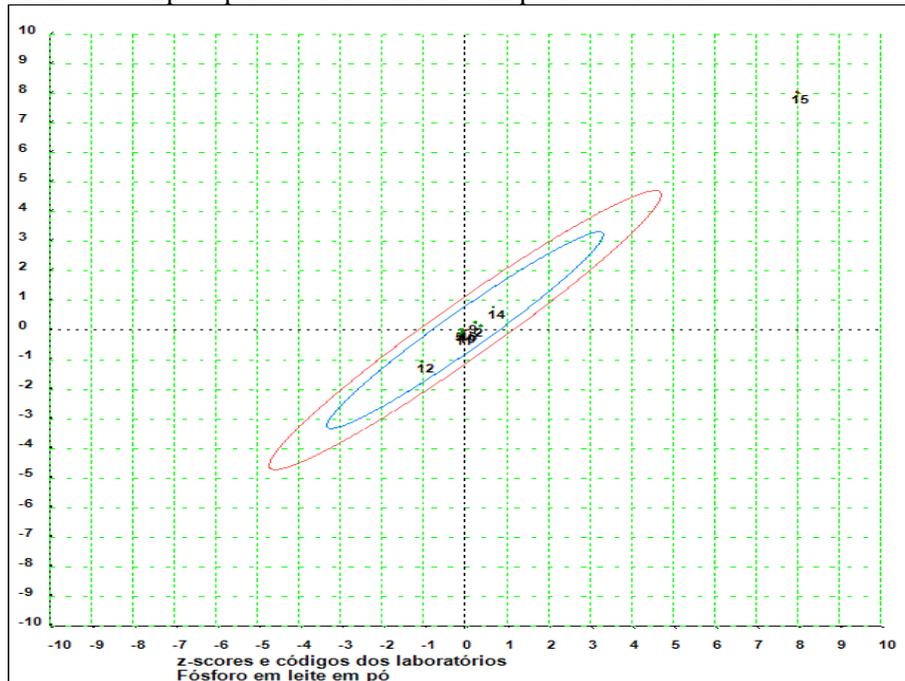
Fonte: Autor (2020).

**Figura 24** - Gráfico de elipses para sódio em leite em pó nos dois itens de ensaio



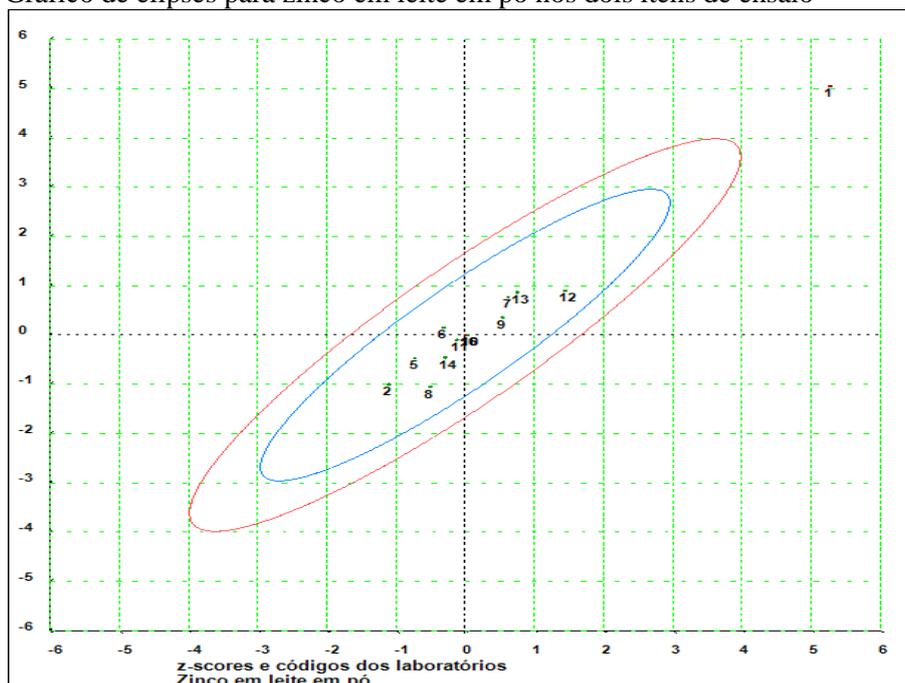
Fonte: Autor (2020).

**Figura 25** - Gráfico de elipses para fósforo em leite em pó nos dois itens de ensaio



Fonte: Autor (2020).

**Figura 26** - Gráfico de elipses para zinco em leite em pó nos dois itens de ensaio



Fonte: Autor (2020).

Após as etapas de tratamento dos dados, cada laboratório foi informado individualmente sobre a aceitabilidade de seus resultados, a fim de identificar as causas da possível variabilidade ocorrida nos procedimentos adotados nas análises.

## 2.28. Estimativa da fração em massa e incerteza combinada

Os resultados da incerteza padrão associada à caracterização ( $u_{char}$ ), obtidos através da Equação (18) são apresentados na Tabela 13, de acordo com os parâmetros da ANOVA provenientes dos valores aceitos fornecidos no estudo interlaboratorial. Os valores de propriedade para a fração em massa dos elementos avaliados foram obtidos através dos resultados fornecidos pelos laboratórios participantes do estudo colaborativo. Para o conjunto de dados aceitos, teste z-scores robusto foi aplicado [83, 90] e, portanto, valores considerados insatisfatórios ( $|z| \geq 3,0$ ) foram excluídos para a obtenção do valor de propriedade de cada elemento. A incerteza expandida ( $U_{RM}$ ) foi calculada considerando as contribuições das incertezas associadas à caracterização ( $u_{char}$ ), homogeneidade entre frascos ( $u_{bb}$ ) e estabilidade a longo prazo ( $u_{lts}$ ), conforme recomendado pelo ISO Guia 35 – Equação (12).

$$u_{char}^2 = \frac{[(MS_{among} - MS_{within}) + MS_{within}]}{np} \quad \text{Equação (18)}$$

$n$  é o número de medições realizadas e  $p$  é o número de laboratórios participantes do estudo.

**Tabela 13** - Valores de propriedade e estimativa das incertezas padrão referente à caracterização ( $u_{char}$ ), homogeneidade entre frascos ( $u_{bb}$ ), estabilidade longo prazo ( $u_{lts}$ ) e incerteza combinada ( $U_{RM}$ ) para a fração em massa de cada elemento para o candidato a MRL de leite em pó

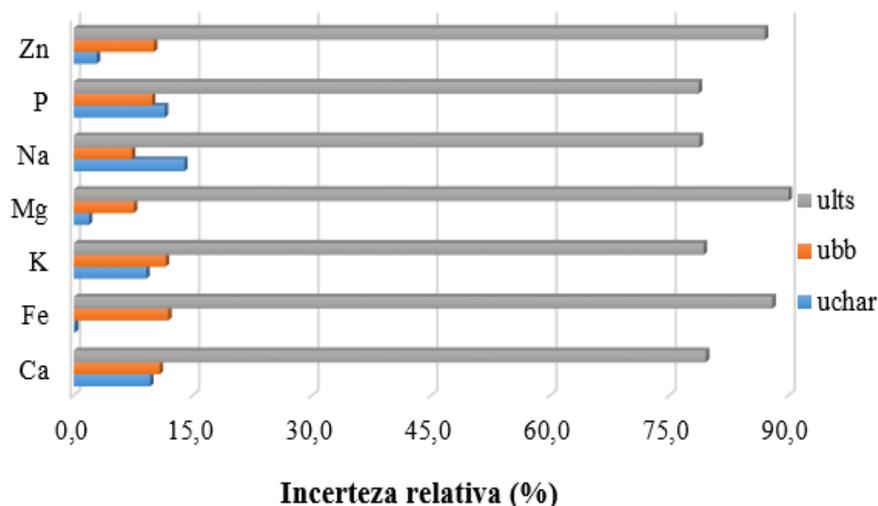
Elemento	Fração em massa (mg g <sup>-1</sup> )	$u_{char}$	$u_{bb}$	$u_{lts}$	$U_{RM}$
Ca	8,795	0,068	0,076	0,559	1,137
Fe	0,107	1,423 x 10 <sup>-5</sup>	0,001	0,008	0,017
K	11,727	0,112	0,142	0,975	1,983
Mg	0,841	0,001	0,005	0,062	0,125
Na	3,654	0,058	0,031	0,329	0,672
P	7,572	0,084	0,072	0,576	1,174
Zn	0,032	7,757 x 10 <sup>-5</sup>	2,711 x 10 <sup>-4</sup>	0,002	0,005

Fonte: Autor (2020).

É importante mencionar que a incerteza associada à estabilidade a longo prazo foi aquela que contribuiu de forma mais significativa para a incerteza expandida de todos os elementos (ver Figura 27). O período de estudo é a principal razão. De forma geral, existem várias fontes que podem contribuir para o aumento da incerteza durante o desenvolvimento de

um novo MR [107], entretanto o analista deve, sempre que possível, buscar alternativas para tentar minimizá-las.

**Figura 27** – Contribuição relativa de cada componente para a incerteza expandida dos elementos estudados



Fonte: Autor (2020).

## 2.29. Conclusões parciais

A análise multivariada de dados (PCA e HCA) demonstrou ser uma ferramenta bastante útil para a extração de uma grande quantidade de informações durante a avaliação da homogeneidade e estabilidade do candidato a material de referência de leite em pó. Apesar da ANOVA indicar que não havia diferença significativa durante o estudo da massa mínima, apenas através da PCA foi possível verificar que Fe e Mg são as variáveis que mais contribuíram para a dispersão dos resultados quando uma amostra de 100 mg foi utilizada.

O material foi considerado homogêneo para Ca, Fe, K, Mg, Na, P e Zn, como evidenciado através dos estudos intra e entre frascos. De acordo com a ANOVA foi possível provar que não existe diferença significativa entre os frascos investigados nesses dois estudos para um nível de confiança de 95%. Alternativamente, a aplicação de PCA para os estudos de homogeneidade intra-frasco e entre frascos demonstrou que nas duas primeiras componentes principais as amostras são distribuídas de forma totalmente aleatória em termo de escores, indicando a formação de um único agrupamento e confirma que o material é homogêneo para as condições estabelecidas neste estudo. A obtenção de HCA para o estudo entre frascos também foi uma ferramenta importante e indicou a similaridade entre as amostras através da distância de ligação entre os grupos.

Para o estudo da estabilidade, a ANOVA indicou que os valores de  $F_{\text{calculado}}$  foram menores que o  $F_{\text{crítico}}$  para um nível de significância de 5% para todos os elementos nas diferentes temperaturas e períodos de tempo avaliados, confirmando que o material é estável para Ca, Fe, K, Mg, Na, P e Zn. Os resultados obtidos por meio da PCA não revelam qualquer evidência que possa questionar a estabilidade do material nas temperaturas e períodos estudados.

Através da HCA é possível verificar que, para todas as amostras, as distâncias de ligação refletem alta similaridade entre os grupos formados, o que confirma que não há diferença significativa entre elas e ratifica que, independente da temperatura, o material é estável para os elementos estudados.

A caracterização do candidato a material de referência de leite em pó foi realizada através de comparação interlaboratorial que contou com laboratórios nacionais e um internacional. Após a aplicação dos testes de Grubbs, Cochran e z-scores para a identificação e exclusão dos valores atípicos, o valor de propriedade foi definido como a média dos resultados considerados aceitáveis. Dessa forma, as frações em massa e a incerteza combinada ( $U_{RM}$ ) foram as seguintes ( $\text{mg g}^{-1}$ ): Ca ( $8,795 \pm 1,137$ ), Fe ( $0,107 \pm 0,017$ ), K ( $11,727 \pm 1,983$ ), Mg ( $0,841 \pm 0,125$ ), Na ( $3,654 \pm 0,672$ ), P ( $7,572 \pm 1,174$ ) e Zn ( $0,032 \pm 0,005$ ).

A incerteza associada à estabilidade a longo prazo ( $u_{lts}$ ) foi aquela que contribuiu de forma mais significativa para a incerteza combinada ( $U_{RM}$ ) em função do tempo de estudo. Parâmetros de regressão linear foram importantes e ratificaram que as concentrações dos elementos de interesse no novo material de referência não sofreram influência das condições adotadas no estudo. A fração em massa de P deve ser monitorada com frequência durante a vida útil do MR.

Os resultados obtidos nesse estudo são bastantes promissores e confirmam que PCA e HCA são ferramentas alternativas oportunas para a obtenção de informações relevantes durante diferentes fases de preparação de um material de referência.

A elipse de confiança consistiu em uma ferramenta simples e rápida para a visualização de valores discrepantes fornecidos pelos laboratórios, bem como classificá-los em função da possível ocorrência de erros sistemáticos ou aleatórios.

O novo material pode ser uma boa alternativa para avaliar procedimentos de rotina, controle de qualidade e validação de métodos analíticos relacionados com amostra de leite e derivados.

## CAPÍTULO II

### **Determinação simultânea de cromo e ferro em leite em pó usando espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua em forno de grafite**

### **3. INTRODUÇÃO**

O consumo de leite e seus derivados é destaque em todo o mundo por serem alimentos de alto valor nutricional e presentes em sua composição gorduras, proteínas, carboidratos, minerais e vitaminas, essenciais para a saúde humana [53, 54, 124]. O leite em pó é uma forma desidratada desse alimento, cuja longevidade é prolongada, mas mantém a composição dos alimentos não industrializados. Em alguns países, esse alimento foi enriquecido com ferro e várias vitaminas, conforme recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Ferro e cromo estão entre os elementos que podem estar presentes nas amostras de leite. O ferro é um dos principais componentes da hemoglobina e influencia a atividade das enzimas mitocondriais e o metabolismo dos músculos. A deficiência de ferro pode causar anemia nutricional, muito comum em crianças e mulheres grávidas [129-132]. O cromo é um metal que pode ser essencial ou tóxico para os seres humanos, dependendo de sua forma química ou ingestão diária. Sua essencialidade tem sido associada ao funcionamento do metabolismo de carboidratos e lipídios. Assim, vários estudos relataram a influência do cromo na ação da insulina e tolerância à glicose em pacientes diabéticos [133]. Além disso, outros elementos químicos também estão presentes no leite e muitos métodos analíticos foram desenvolvidos para análises inorgânicas do leite e seus derivados [134-138].

A espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua em forno de grafite (HR-CS GFAAS) é uma técnica analítica relativamente moderna [139], que permite a análise de amostras sólidas [140-142], bem como a determinação simultânea ou sequencial de elementos químicos [143, 144]. Portanto, essas determinações multi-elementares são realizadas com menor consumo de modificador químico e maior frequência analítica. Assim, muitos métodos foram propostos para quantificação simultânea de dois ou mais elementos empregando essa ferramenta analítica [143, 145-155]. Resano et al. [153] estabeleceram um método para a determinação simultânea de cobalto, ferro, chumbo e níquel em nanotubos de carbono. Welz et al. [146] quantificaram molibdênio e níquel em vinho e em alterações do solo. Zambrzycka-Szelewa et al. [155] propuseram uma estratégia analítica para a

determinação simultânea direta de quantidades traço de ródio e rutênio na água de rio, no escoamento de estrada e no esgoto municipal. Ozbek e Ozcan [151] determinaram cobalto, alumínio e ferro em amostras de águas residuais. Valdivia et al. [154] desenvolveram um método para a determinação simultânea de vanádio, níquel e ferro em fuligem de combustíveis. No Grupo de Pesquisa em Química e Quimiometria (GRPQQ) da Universidade Federal da Bahia foram propostos métodos para determinação simultânea de cobre e ferro em farinhas [149] e cádmio, ferro e estanho em enlatados [150]. Pozzatti et al. [152] quantificaram níquel e ferro em vegetais da família *Solanaceae*. Almeida et al. [145] otimizaram um método para a determinação de ferro e níquel em óleos vegetais. Vale et al. [147] desenvolveram um método sequencial e simultâneo para a determinação de cádmio, alumínio, cromo e ferro em amostras de solo usando HR-CS GFAAS. As linhas escolhidas para o cromo e ferro foram 425,433 e 425,076 nm, respectivamente. Welz e Becker-Ross [148] propuseram uma estratégia analítica para a determinação simultânea direta de Cr e Fe no petróleo bruto. As linhas de absorção empregadas foram 358,120 nm para ferro e 357,868 nm para cromo

### **3.1. Objetivos**

### **3.2. Objetivo geral**

O presente trabalho propõe um método para a determinação simultânea de cromo e ferro em leite em pó usando HR-CS GFAAS, empregando as mesmas linhas utilizadas por Welz e Becker-Ross.

### **3.3. Objetivos específicos**

- Investigar a possibilidade do uso de linhas simultâneas para a determinação de Cr e Fe em leite em pó por HR-CS GFAAS;
- Otimizar as condições experimentais para as etapas de pirólise e atomização por meio da utilização de linhas simultâneas;
- Aplicar o método proposto para a determinação do teor de Cr e Fe em amostras de leite em pó;

### **3.4. Procedimento experimental**

### **3.5. Reagentes, soluções e amostras**

Todas as soluções utilizadas foram preparadas usando água de alta pureza com resistividade de 18,2 M $\Omega$  cm obtida a partir de um sistema de purificação de água Milli-Q da Millipore (Bedford, MA, EUA). Além disso, os reagentes utilizados em todos os experimentos foram de grau analítico, com ácido nítrico 65% (m/m) e peróxido de hidrogênio a 30% (v/v), ambos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Os padrões de calibração dos elementos cromo e ferro foram preparados diariamente por soluções de diluições apropriadas a partir da solução estoque (Merck) contendo 1000 mg L<sup>-1</sup> dos elementos. Assim, cinco pontos foram preparados na faixa de 0,58 a 5,00  $\mu$ g L<sup>-1</sup> para cromo e 0,39 a 1,00 mg L<sup>-1</sup> para ferro, além do branco. Uma solução de alumínio de 1000 mg L<sup>-1</sup> foi empregada como modificador químico. Todas as amostras de leite em pó integral foram compradas em supermercados da cidade de Salvador, Bahia, Brasil, em dezembro de 2017. Para descontaminação, todos os vidros e vasos de laboratório foram mantidos por um período de 24 h em solução de ácido nítrico a 10% (v/v), lavados em água deionizada e secos em um ambiente livre de poeira antes do uso. Durante a análise, as amostras foram digeridas usando radiação assistida por micro-ondas.

### **3.6. Instrumentação**

Todas as medições analíticas foram realizadas utilizando um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua em forno de grafite modelo ContrAA 700 da Analytik Jena AG (Jena, Alemanha) do Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia. Esse espectrômetro está equipado com uma lâmpada de arco curto Xe (GLE, Berlim, Alemanha), que opera em altas temperaturas (modo *hot spot*), como fonte de radiação contínua com um potencial nominal de 300 W, um monocromador duplo Echelle de alta resolução e um detector que é constituído por um arranjo linear de dispositivos de carga acoplada (CCD). Tubo de grafite revestido piroliticamente com plataforma integrada, fornecido pelo mesmo fabricante, foi utilizado durante a análise. O argônio com 99,998% de pureza foi adquirido da White Martins (Salvador, BA, Brasil) e usado como gás de purga e proteção com vazão de 2,0 L min<sup>-1</sup> em todas as etapas do aquecimento, exceto durante a atomização, quando o fluxo de gás foi parado. Todas as medições simultâneas foram realizadas usando a linha de absorção atômica primária de cromo (357,869 nm) e uma linha

de absorção atômica secundária de ferro (358,120 nm). Os sinais de absorvância foram obtidos por área de pico utilizando um tempo de integração de 5,0 s e três pixels (pixel central mais os adjacentes,  $CP \pm 1$ ) para ambos os analitos. As temperaturas de pirólise e atomização foram otimizadas por metodologia univariada através das curvas convencionais empregadas no GFAAS. O programa de aquecimento do forno de grafite para a determinação simultânea de cromo e ferro é mostrado na Tabela 14. A mineralização das amostras de leite em pó foi realizada usando um forno de micro-ondas modelo ETHOS EZ da Milestone (Sorile, Itália) do Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia. Os frascos têm uma capacidade de volume de 100 mL e uma pressão de até 100 bar.

**Tabela 14** - Programa de temperatura adotado para a determinação simultânea de Cr e Fe em soluções digeridas de leite por HR-CS GFAAS

Etapa	Temperatura/°C	Rampa /°C s <sup>-1</sup>	Tempo de permanência/ s	Vazão do argônio/L min <sup>-1</sup>
Secagem 1	80	6	20	2
Secagem 2	90	3	20	2
Secagem 3	110	5	10	2
Pirólise	350	50	20	2
Pirólise	1000	300	10	2
Auto zero	1000	0	5	2
Atomização	2500	1500	6	0
Limpeza	2551	500	4	2

Fonte: Autor (2020).

Para validação do método proposto, análises em espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado foram realizadas usando um NexION 300D ICP-MS (Perkin Elmer, Shelton, EUA), equipado com um sistema de introdução de amostras por uma bomba peristáltica, um nebulizador concêntrico e uma câmara ciclônica de passagem dupla, instalado no Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia. Argônio 99,999% (White Martins, São Paulo, Brasil) foi utilizado como gás transportador de plasma e aerossol no ICP-MS. Rh 10 µg L<sup>-1</sup> foi utilizado como padrão interno e os isótopos escolhidos para as determinações foram Cr<sup>53</sup> e Fe<sup>57</sup>. Os parâmetros operacionais do instrumento ICP-MS são mostrados na Tabela 15.

**Tabela 15** - Condições operacionais do ICP-MS para a determinação de Cr e Fe em amostras de leite em pó

<b>Potência de RF</b>	1500 W
<b>Fluxo do gás</b>	
Principal	16,0 L min <sup>-1</sup>
Auxiliar	1,2 L min
Nebulizador	1,04 L min <sup>-1</sup>
<b>Cones Sampler e skimmer</b>	Ni
<b>Medida de sinal</b>	<i>Peak Hopping</i>
<b>Leitura por replicata</b>	50
<b>Replicatas</b>	3
<b>Tempo de espera</b>	25ms
<b>Modo de lente automática</b>	Ligado
<b>Detector</b>	
Modo de operação do detector	Dual
Pulso	1.400 V
Analógico	-1.650 V
<b>Nebulizador</b>	
Câmara ciclônica	Dupla passagem
Nebulizador pneumático	Concêntrico

Fonte: Autor (2020).

### 3.7. Procedimento de digestão das amostras de leite em pó

Amostras de leite de 0,25 g foram pesadas em frascos de micro-ondas. Posteriormente, foram adicionados 2,0 mL de ácido nítrico a 65% (m/m), 1,0 mL de peróxido de hidrogênio a 30% (v/v) e 5,0 mL de água ultrapura[156]. Finalmente, os frascos foram convenientemente fechados e, em seguida, submetidos ao programa de aquecimento, conforme mostrado na Tabela 2 – item 2.17. Após a etapa de resfriamento, os frascos foram abertos e as soluções digeridas foram diluídas quantitativamente em frascos volumétricos até um volume final de 12,0 mL, usando água ultrapura. Os brancos analíticos foram preparados de maneira semelhante. Este procedimento foi realizado em triplicata para todas as amostras no Laboratório de Química Analítica do GRPQQ da Universidade Federal da Bahia.

### **3.8. Procedimento para a determinação simultânea de Cr e Fe em amostras de leite em pó**

Durante a determinação simultânea de cromo e ferro, 15,0 µL da solução digerida das amostras de leite ou branco analítico foram injetados no tubo de grafite e 5,0 µL da solução modificadora química foram co-injetados. A escolha do modificador químico foi baseada em estudos anteriores [157, 158]. Em seguida, a mistura foi submetida ao programa de temperatura mostrado na Tabela 14. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

### **3.9. Resultados e discussão**

#### **3.10. Linhas analíticas usadas para a determinação simultânea de cromo e ferro**

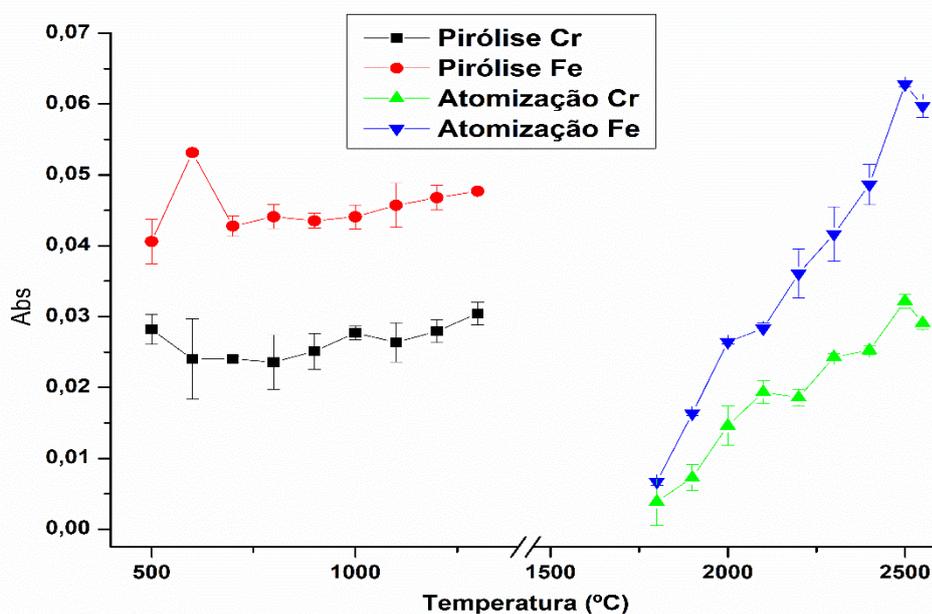
A determinação simultânea de elementos químicos empregando HR-CS GFAAS é possível quando as linhas atômicas dos elementos estão na mesma janela espectral permitida pelo detector de matriz CCD [143]. Portanto, para o cromo, a linha de ressonância primária escolhida foi de 357,869 nm (a maior sensibilidade para esse elemento), uma vez que o teor desse metal nas amostras de leite é baixo. A linha secundária (358,120 nm) foi escolhida para o ferro, que é cerca de 98 vezes menos sensível que a linha de ressonância primária (248,327 nm) [159], considerando que o teor de ferro é alto para algumas amostras de leite, a condição da análise é perfeitamente aplicável. Os números de pixels empregados para as determinações foram três para os dois elementos ( $CP \pm 1$ ), considerando a sensibilidade requerida na análise, conforme descrito por Heitmann et al. [160].

#### **3.11. Otimização das condições experimentais para as etapas de pirólise e atomização**

A determinação das temperaturas de pirólise e atomização ideais para quantificação simultânea de cromo e ferro foi realizada através de uma amostra de leite digerido utilizando alumínio como modificador químico, de acordo com estudos anteriores [157, 158]. Esse modificador aumenta a estabilidade térmica do analito com a obtenção de temperaturas de pirólise mais altas e, conseqüentemente, melhor eliminação da matriz [157]. Primeiramente, a temperatura de pirólise variou de 500 a 1300 °C, e a temperatura de atomização foi fixada em 2300 °C. Como pode ser visto na Figura 28, a temperatura de 1000 °C produz sinais analíticos

para ambos os elementos com a mais alta precisão na faixa estudada. Posteriormente, a temperatura de atomização variou de 1800 a 2550 ° C, usando 1000 ° C como temperatura de pirólise. A Figura 28 mostra que os sinais de absorvância máxima foram obtidos à temperatura de 2500 ° C para ambos os analitos. Assim, foi estabelecido o programa de aquecimento do forno de grafite, recomendando as temperaturas de pirólise e atomização de 1000 e 2500 ° C, respectivamente.

**Figura 28** - Efeito das temperaturas de pirólise e atomização sobre a determinação simultânea de Cr e Fe em amostras de leite usando HR-CS GFAAS



Fonte: Autor (2020).

A determinação simultânea direta de cromo e ferro no petróleo requer uma temperatura de pirólise de 1400 ° C para garantir uma decomposição completa da matriz complexa [148].

### 3.12. Características analíticas do método proposto

A determinação da técnica de calibração ideal para a quantificação dos dois elementos foi realizada envolvendo experimentos de curvas de calibração externas com padrões aquosos e curvas de adição de analito em uma amostra de leite digerido. Os resultados obtidos, como pode ser visto na Tabela 16, demonstraram que não há diferença significativa entre as inclinações (expressas como intervalo de confiança a 95%) obtidas pelas curvas de calibração

com padrões aquosos e as inclinações encontradas pelas curvas de adição do analito. Isso significa que o cromo e o ferro podem ser determinados usando a técnica de calibração externa, empregando padrões aquosos dos elementos. Essas curvas têm linearidade na faixa de 0,58 a 5,00  $\mu\text{g L}^{-1}$  para cromo e 0,39 a 1,00  $\text{mg L}^{-1}$  para ferro. Portanto, utilizando as condições otimizadas, esse método permite a determinação de cromo e ferro com limites de detecção e quantificação de 0,17  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 0,12  $\text{mg L}^{-1}$  e 0,58  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 0,39  $\text{mg L}^{-1}$ , respectivamente. Considerando uma massa de leite de 0,25 g, os limites de detecção e quantificação de cromo e ferro são 8 e 28  $\text{ng g}^{-1}$  e 5 e 19  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados como 3 e 10 vezes o desvio padrão de dez medições do branco dividido pela inclinação da curva de calibração. A massa característica ( $m_0$ ) que é definida como a massa do analito que produz uma absorvância de 0,0044 s foi determinada para ambos os elementos. Os valores obtidos também são mostrados na Tabela 16. A precisão do método expressa como desvio padrão relativo (RSD%) foi determinada para os dois elementos considerando os resultados de dez repetições de uma amostra de leite digerido. Os valores encontrados foram 3,9% para cromo e 2,6% para ferro. Nessa amostra, as concentrações de cromo e ferro foram de 0,76  $\mu\text{g g}^{-1}$  e 151,3  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente.

**Tabela 16** – Características analíticas do método proposto.

	<b>Cromo (357,869 nm)</b>	<b>Ferro (358,120 nm)</b>
Inclinação (calibração externa)	$(3,37 \pm 0,44) \times 10^{-4} \text{ s pg}^{-1}$	$(2,96 \pm 0,30) \times 10^{-3} \text{ s ng}^{-1}$
Inclinação (adição de analito)	$(3,68 \pm 0,49) \times 10^{-4} \text{ s pg}^{-1}$	$(3,43 \pm 0,23) \times 10^{-3} \text{ s ng}^{-1}$
Massa característica ( $m_0$ )	13 pg	1,5 ng
LOD ( $3\sigma/\alpha$ )	8 $\text{ng g}^{-1}$	5 $\mu\text{g g}^{-1}$
LOQ ( $10\sigma/\alpha$ )	28 $\text{ng g}^{-1}$	19 $\mu\text{g g}^{-1}$
Precisão como RSD (n=10)	3,9%	2,6%

Fonte: Autor (2020).

Para avaliação da exatidão, amostras de leite em pó digeridas foram analisadas pelo método proposto e também empregando espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), conforme Tabela 17. Os resultados obtidos pelos dois métodos mostraram concordância satisfatória e são comparáveis de acordo com o teste t pareado para um nível de confiança de 95%. Portanto, esses resultados confirmaram a exatidão do método.

**Tabela 17** - Determinação simultânea de Cr e Fe em amostras de leite usando HR-CS GFAAS e ICP-MS

Amostras	HR-CS GFAAS ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )*		ICP-MS( $\mu\text{g g}^{-1}$ )*	
	Cromo	Ferro	Cromo	Ferro
1	0,76 $\pm$ 0,08	151,3 $\pm$ 8,0	0,72 $\pm$ 0,4	145,4 $\pm$ 2,0
2	0,52 $\pm$ 0,07	< 19	0,38 $\pm$ 0,13	< 0,214
3	0,80 $\pm$ 0,09	199,1 $\pm$ 15,5	0,88 $\pm$ 0,17	173,7 $\pm$ 15,7
4	0,43 $\pm$ 0,05	< 19	***	***
5	0,41 $\pm$ 0,01	< 19	***	***

Fonte: Autor (2020). \*Expresso como intervalo de confiança a 95% e n=3; \*\*\*Não determinado

A determinação de Cr e Fe pode ser problemática no ICP-MS devido às interferências espectrais possíveis para os isótopos mais abundantes de Cr e Fe (isótopos 52 para Cr e 56 para Fe). Para esses isótopos, existe a possibilidade da formação dos isótopos poliatômicos  $\text{Ar}^{40}\text{C}^{12}$ ,  $\text{Ar}^{40}\text{O}^{16}$  e  $\text{Ca}^{40}\text{O}^{16}$ , mas para evitar a ocorrência dessas interferências foram escolhidos os isótopos  $\text{Cr}^{53}$  e  $\text{Fe}^{57}$ . Com essa abordagem, a sensibilidade foi reduzida, mas a exatidão foi assegurada.

O ICP-MS é uma técnica que fornece limites de detecção muito baixos, mas é uma técnica cara, principalmente para a quantificação de poucos elementos, como neste caso. Por outro lado, HR-CS GF AAS é uma técnica que fornece boa sensibilidade e garante bons limites de detecção, mas fornece análises em menor frequência analítica. No entanto, o método desenvolvido, aplicando a detecção simultânea, melhora a frequência analítica, mas utiliza linhas secundárias, agravando a sensibilidade e consequentemente o LD. De qualquer forma, o método desenvolvido é uma alternativa promissora para a determinação de Cr e Fe em amostras de leite.

Os limites de quantificação obtidos neste trabalho são relativamente compatíveis com os encontrados por Welz e Becker-Ross [148]. Eles desenvolveram um método para determinação simultânea de cromo e ferro em petróleo bruto usando as mesmas linhas atômicas. As temperaturas de pirólise e atomização foram de 1400 e 2500 °C, respectivamente, sem modificador químico. Os limites de quantificação obtidos foram 4 ng g<sup>-1</sup> para cromo e 2  $\mu\text{g g}^{-1}$  para ferro.

### **3.13. Aplicação – determinação de cromo e ferro em amostras de leite em pó.**

O método proposto foi empregado para a determinação de cromo e ferro em cinco amostras de leite em pó adquiridas no Estado da Bahia, Brasil. As amostras foram previamente digeridas usando radiação assistida por micro-ondas. O valor médio do branco ( $n = 3$ ) para o ferro ficou abaixo do limite de quantificação e para o cromo foi igual a  $1,83 \mu\text{g L}^{-1}$ . A concentração encontrada variou de  $0,43$  a  $0,81 \mu\text{g g}^{-1}$  para o cromo. Para o ferro, três amostras têm uma concentração de ferro menor que  $19 \mu\text{g g}^{-1}$  (limite de quantificação). Todos os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 17. Os teores de cromo e ferro obtidos estão de acordo com os encontrados em outros trabalhos [135, 138, 161, 162]. Nesses estudos, o ferro e o cromo foram quantificados através de diferentes técnicas analíticas (FAAS, WDXRF, ICP-MS e ICP OES), utilizando amostragem sólida e também procedimentos variados para a digestão de amostras de leite, como digestão parcial com ácido clorídrico em placa de aquecimento, pelo aparelho Kjeldahl e usando bloco digestor.

Assim, embora a determinação simultânea de dois ou mais elementos no HR-CS GF AAS seja limitada, já que os outros elementos devem apresentar linhas de absorção atômica na mesma janela espectral permitida pelo detector de matriz CCD para o primeiro elemento [143], o presente trabalho oferece outra possibilidade que pode ser utilizada para a determinação de cromo e ferro. Dessa maneira, o rendimento da amostra pode ser aumentado significativamente, pois na determinação de dois elementos o tempo será reduzido pela metade. Outras vantagens são o consumo reduzido de reagentes e tubo de grafite.

### **3.14. Conclusões parciais**

O programa de aquecimento do micro-ondas estabelecido para digestão de amostras de leite em pó foi relativamente longo, porque essas matrizes têm um alto teor de gordura.

O método proposto possui precisão, exatidão e sensibilidade necessárias para a determinação de cromo e ferro em amostras de leite.

Esse método é muito oportuno, considerando a importância da determinação de nutrientes e elementos tóxicos no leite, conforme citado.

O teor de cromo e ferro encontrado nas análises das amostras é compatível com os dados publicados na literatura.

A determinação simultânea usando HR-CS GF AAS alivia as principais desvantagens do GFAAS convencional, que são o tempo alto exigido pela análise e o consumo de tubo de grafite pelo analito quantificado.

## 4. CONCLUSÕES GERAIS

O desenvolvimento de um MR de leite em pó permitiu a obtenção de um produto que pode ser disponibilizado para laboratórios locais e regionais para ser utilizado nas diversas etapas do procedimento analítico, tais como calibração de instrumentos, validação de métodos analíticos e processos de controle de qualidade em matrizes de leite e seus derivados.

A utilização da análise multivariada de dados (PCA e HCA) é uma ferramenta estatística bastante consolidada e que pode ser aplicada para avaliar as diversas etapas durante o desenvolvimento de MR. Através desse recurso, a visualização de informações importantes do processo é maximizada, pois o conjunto original dos dados é convertido em uma quantidade menor de variáveis que permitem ao pesquisador a obtenção de respostas que seriam bem mais complexas se fosse analisada cada variável individualmente. Nesse caso, PCA e HCA são ferramentas promissoras para servir de alternativa à ANOVA.

Durante o desenvolvimento de um MR todas as etapas devem ser criteriosamente planejadas e seus resultados investigados com bastante atenção para identificação e correção previamente de possíveis discrepâncias no conjunto de dados para evitar valores indesejados na incerteza associada a cada etapa de medição. A escolha dos laboratórios participantes do estudo interlaboratorial, que é uma fase crucial do processo, deve levar em consideração aqueles laboratórios igualmente capazes, conforme recomendado pela ISO Guia 35.

O uso de estratégias analíticas para a determinação simultânea de analitos nas diversas amostras constitui em mais uma alternativa bastante interessante, tendo em vista as seguintes razões: consumo reduzido de reagente e tubo de grafite e maior frequência analítica, que é vantajoso principalmente em técnica como GF AAS. Portanto, a determinação simultânea de cromo e ferro em amostras de leite em pó é mais uma estratégia que pode ser usada para o controle de qualidade nessa matriz alimentícia.

## 5. REFERÊNCIAS

- [1] A.M.P. dos Santos, L.O. dos Santos, G.C. Brandao, R.G.O. Araujo, F.A. de Santana, V.A. Lemos, M.A. Bezerra, D.S. Anunciação, L.A. Portugal, E. Palacio, F.M. de Oliveira, E.G. Moreira, R.J.L. Garcia, D.d.C. Lima, R.E.S. Froes, Preparation and characterization of a new reference material for the inorganic analysis of corn flour, *Accreditation and Quality Assurance* 22(1) (2016) 37-43.
- [2] ISO GUIDE 30. Termos e definições relacionados com materiais de referência., **ABNT** (2000) p. 1.
- [3] ISO Guide 35, Reference materials - guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability, International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 2017.
- [4] M. Yang, M. Wang, J. Zhou, Y. Song, T. Wang, Development of a new certified reference material of tinidazole for quality and safety of agro-products, *Accreditation and Quality Assurance* 21(5) (2016) 341-349.
- [5] K.C. Tsimillis, Measurement uncertainty: requirements set in the accreditation standards, *Accreditation and Quality Assurance* 23(2) (2018) 109-114.
- [6] H. Polkowska-Motrenko, R.S. Dybczyński, E. Chajduk, Certification of reference materials for inorganic trace analysis: the INCT approach, *Accreditation and Quality Assurance* 15(4) (2010) 245-250.
- [7] J. Pauwels, A. Lamberty, CRMs for the 21st century: new demands and challenges, *Fresenius J Anal Chem* 370 (2001) 111–114.
- [8] I.R.B. Olivares, G.B. Souza, A.R.A. Nogueira, G.T.K. Toledo, D.C. Marcki, Trends in developments of certified reference materials for chemical analysis - Focus on food, water, soil, and sediment matrices, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 100 (2018) 53-64.
- [9] C. Liu, Z. Ding, Y. Tian, L. Yi, N. Huang, Discussion on homogeneity assessment of reference materials based on uncertainty comparison method, *Accreditation and Quality Assurance* 23(2) (2018) 103-108.
- [10] J. Bok-Badura, A. Jakóbi-Kolon, M. Turek, J. Szczerba, M. Lemanowicz, K. Karoń, A novel method for simultaneous determination of selected elements in dolomite and magnesia by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy with slurry sample introduction, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 113 (2015) 79-83.
- [11] S.L.C. Ferreira, M. Miró, E.G.P. da Silva, G.D. Matos, P.S. dos Reis, G.C. Brandao, W.N.L. dos Santos, A.T. Duarte, M.G.R. Vale, R.G.O. Araujo, Slurry Sampling—An Analytical Strategy for the Determination of Metals and Metalloids by Spectroanalytical Techniques, *Applied Spectroscopy Reviews* 45(1) (2010) 44-62.

- [12] M. Liu, T. Liu, J. Liu, X. Mao, X. Na, L. Ding, G. Chen, Y. Qian, Determination of arsenic in biological samples by slurry sampling hydride generation atomic fluorescence spectrometry using in situ dielectric barrier discharge trap, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 34(3) (2019) 526-534.
- [13] B. Gómez-Nieto, M.J. Gismera, M.T. Sevilla, J.R. Procopio, Simultaneous and direct determination of iron and nickel in biological solid samples by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Talanta* 116 (2013) 860-865.
- [14] R. Mior, S. Morés, B. Welz, E. Carasek, J. B de Andrade, Determination of sulfur in coal using direct solid sampling and high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry of the CS molecule in a graphite furnace, *Talanta* 106C (2013) 368-374.
- [15] M. Parengam, K. Judprasong, S. Srianujata, S. Jittinandana, S. Laoharajanaphand, A. Busamongko, Study of nutrients and toxic minerals in rice and legumes by instrumental neutron activation analysis and graphite furnace atomic absorption spectrophotometry, *Journal of Food Composition and Analysis* 23(4) (2010) 340-345.
- [16] N. Sadiq, D. Beauchemin, Optimization of the operating conditions of solid sampling electrothermal vaporization coupled to inductively coupled plasma optical emission spectrometry for the sensitive direct analysis of powdered rice, *Analytica Chimica Acta* 851 (2014) 23-29.
- [17] ISO GUIDE 32. Calibração em química analítica e uso de materiais de referência certificados., **ABNT** (2000) p. 4.
- [18] L.L. Yu, C.P. Verdon, W.C. Davis, G.C. Turk, K.L. Caldwell, R.L. Jones, B. Buckley, R. Xie, A human urine standard reference material for accurate assessment of arsenic exposure, *Analytical Methods* 3(5) (2011) 1107-1115.
- [19] International Union of Pure and Applied Chemistry, Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis, *Pure Appl. Chem* 74 (2002) 835-855.
- [20] L.O. Dos Santos, Desenvolvimento e aplicação de um candidato a material de referência de laboratório, Tese (Doutorado), Universidade Federal da Bahia., 2016.
- [21] ISO GUIDE 33. Utilização de materiais de referência certificados., **ABNT** (2002) p. 28.
- [22] L.S. Kato, E.A. De Nadai Fernandes, M.A. Bacchi, C. Elias, S.R. Vicino Sarriés, G.A. Sarriés, P.S. Modolo, Instrumental neutron activation analysis for assessing homogeneity of a whole rice candidate reference material, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 297(2) (2012) 271-275.
- [23] M.R. Khan, A. Milà, R. Busquets, F.J. Santos, L. Puignou, Preparation and characterisation of fried chicken as a laboratory reference material for the analysis of heterocyclic amines, *Journal of Chromatography B* 877(22) (2009) 1997-2002.

- [24] P. Jedziniak, T. Szprengier-Juszkiewicz, M. Olejnik, In-house reference materials: 5-hydroxyflunixin and meloxicam in cow milk—preparation and evaluation, *Analytica Chimica Acta* 637(1) (2009) 346-350.
- [25] M. Llauradó, J.M. Torres, J. Tent, A. Sahuquillo, H. Muntau, G. Rauret, Preparation of a soil reference material for the determination of radionuclides, *Analytica Chimica Acta* 445(1) (2001) 99-106.
- [26] A.M.P. Dos Santos, *Material de Referência Botânico: Preparo e Certificação.*, Tese (Doutorado), Universidade Federal da Bahia., 2006.
- [27] A.M.P. dos Santos, D.C. Lima, R.M. de Jesus, S.L.C. Ferreira, Homogeneity and Stability Studies During the Preparation of a Laboratory Reference Material of Soy Leaves for the Determination of Metals, *Journal of AOAC International* 94(6) (2011) 1906-1910.
- [28] J.C. Ulrich., *Preparo e caracterização de um Material de Referência de peixe.*, Tese (Doutorado), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. (2011).
- [29] BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos. Portaria nº 685, de 27 de agosto de 1998., *Diário Oficial da União; Poder Executivo*, de 28 de agosto de 1998., 1998.
- [30] LUIZ DE MAGALHÃES BOTELHO. INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. **Projeto de Lei para criação do INMETRO.** Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br/inmetro/>>, acesso em julho de 2018.
- [31] C.M. Bossu, *Produção e Caracterização de Material de Referência de Forrageira para nutrientes e contaminantes inorgânicos.* , Tese (Doutorado), Universidade Federal de São Carlos., 2013.
- [32] IPT - Instituto de Pesquisas Tecnológicas. **Materiais de Referência Certificados - Confiabilidade em composições químicas e propriedades físicas.** Disponível em: <<https://www.ipt.br/solucoes/54-materiais-de-referencia-certificados.htm>>, acesso em julho de 2018.
- [33] CETEM. Centro de Tecnologia Mineral. **Pesquisadora representou o CETEM em evento sobre materiais de referência no Canadá.** Disponível em: <<http://www.cetem.gov.br/component/content/article?id=1206>>, acesso em julho de 2018.
- [34] VISOMES. **Materiais de Referência Certificados.** Disponível em: <<http://www.visomes.com.br/>>, acesso em julho de 2018.
- [35] EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Materiais de referência certificados para análise laboratorial de suplemento mineral, tecido animal, solo, fosfato de rocha e forrageiras.** Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-solucoes-tecnologicas>>, acesso em julho de 2018.

- [36] E.G. Moreira, Preparo e Caracterização de um Material de Referência de mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758), Tese (Doutorado), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. (2010).
- [37] O.P.d.O. Junior, Preparo, Caracterização e Certificação de Materiais de Referência isotópicos do urânio., Tese (Doutorado), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. (2006).
- [38] L. Castro, Preparo e Caracterização de um Material de Referência de rim bovino., Tese (Doutorado), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. (2017).
- [39] C.S. Da Silva, Produção e avaliação de Materiais de Referência para nutrientes e contaminantes inorgânicos em amostras agrônômicas., Tese (Doutorado), Universidade Federal de São Carlos., 2016.
- [40] T.R. Verhalen, Preparo e Caracterização de Material de Referência de solo para nutrientes e contaminantes inorgânicos., Tese (Doutorado), Universidade Federal de São Carlos. (2014).
- [41] R.L. de Pádua Gandra, A.L.S. dos Santos, P.P.B. dos Santos, R.L. Alvarenga, R.G. Junqueira, R.A. Labanca, S.V.C. de Souza, Production and evaluation of a reference material for moisture, ash, and total fat mass fractions, and titratable acidity in whole milk powder, Accreditation and Quality Assurance 21(1) (2016) 47-55.
- [42] D.C. Lima, Aplicação de técnicas de análise multivariada na caracterização de parâmetros avaliados durante o desenvolvimento de Material de Referência - Certificação de amostras de farinha de trigo., Dissertação (Mestrado), Universidade Federal da Bahia., 2009.
- [43] T. Venelinov, P. Quevauviller, Are certified reference materials really expensive?, TrAC Trends in Analytical Chemistry 22(1) (2003) 15-18.
- [44] K. Kupiec, P. Konieczka, J. Namieśnik, Prospects for the production, research and utilization of reference materials, Critical Reviews in Analytical Chemistry 39(4) (2009) 311-322.
- [45] F. Ulberth, Certified reference materials for inorganic and organic contaminants in environmental matrices, Analytical and bioanalytical chemistry 386(4) (2006) 1121-1136.
- [46] A.B. Shehata, M.S. Rizk, A.M. Farag, I.F. Tahoun, Development of two reference materials for all trans-retinol, retinyl palmitate,  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherol in milk powder and infant formula, Journal of food and drug analysis. 23(1) (2015) 82-92.
- [47] R. Cornelis, H. Crews, O.F.X. Donard, L. Ebdon, P. Quevauviller, Trends in certified reference materials for the speciation of trace elements, Fresenius' Journal of Analytical Chemistry 370(2) (2001) 120-125.

- [48] V. Iyengar, W. Wolf, Global activities in the world of reference materials including the needs of developing countries, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 360(3) (1998) 282-286.
- [49] A.M. van der Veen, Trends in the certification of reference materials, *Accreditation and quality assurance* 9(4-5) (2004) 232-236.
- [50] O. Bercaru, M. Ricci, F. Ulberth, C. Brunori, R. Morabito, I. Ipolyi, A. Sahuquillo, E. Rosenberg, Challenges in preparing water-matrix reference materials for PAHs and pesticides: examples from SWIFT-WFD proficiency-testing schemes, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 28(9) (2009) 1073-1081.
- [51] C. Mazzuca, M. Carbone, R. Cancelliere, S. Prati, G. Sciutto, R. Mazzeo, L. Tositti, R. Regazzi, D. Mostacci, L. Micheli, A new analytical approach to characterize the effect of  $\gamma$ -ray sterilization on wood, *Microchemical Journal* (2018).
- [52] S. Caroli, Certified reference materials: use, manufacture and certification, *Analytica Chimica Acta* 283(1) (1993) 573-582.
- [53] E.Q. Oreste, A.O. de Souza, C.C. Pereira, M.T. Lisboa, M.J.A. Cidade, M.A. Vieira, S. Cadore, A.S. Ribeiro, Evaluation of Sample Preparation Methods for the Determination of Ca, Cu, Fe, K, and Na in Milk Powder Samples by ICP-OES, *Food Analytical Methods* 9(3) (2016) 777-784.
- [54] P.L. Buldini, S. Cavalli, J.L. Sharma, Matrix removal for the ion chromatographic determination of some trace elements in milk, *Microchemical Journal* 72(3) (2002) 277-284.
- [55] C.F. Nascimento, P.M. Santos, E.R. Pereira-Filho, F.R.P. Rocha, Recent advances on determination of milk adulterants, *Food Chemistry* 221 (2017) 1232-1244.
- [56] B. Sezer, S. Durna, G. Bilge, A. Berkkan, A. Yetisemiyen, I.H. Boyaci, Identification of milk fraud using laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS), *International Dairy Journal* 81 (2018) 1-7.
- [57] Y. Lu, Y. Xia, G. Liu, M. Pan, M. Li, N.A. Lee, S. Wang, A Review of Methods for Detecting Melamine in Food Samples, *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 47(1) (2017) 51-66.
- [58] I. De Noni, Reference material needs for quality assessment of milk and dairy products, *Accreditation and Quality Assurance* 9(4-5) (2004) 226-231.
- [59] IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa Trimestral do leite.** Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria.html>>, acesso em junho de 2020.
- [60] A. dos Santos Augusto, P.L. Barsanelli, F.M.V. Pereira, E.R. Pereira-Filho, Calibration strategies for the direct determination of Ca, K, and Mg in commercial samples of powdered

milk and solid dietary supplements using laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS), *Food research international* 94 (2017) 72-78.

[61] E.I. Muller, J.P. Souza, C.C. Muller, A.L. Muller, P.A. Mello, C.A. Bizzi, Microwave-assisted wet digestion with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at high temperature and pressure using single reaction chamber for elemental determination in milk powder by ICP-OES and ICP-MS, *Talanta* 156 (2016) 232-238.

[62] W.V. Sousa, F.L. Silva, S.T. Gouveia, W.O. Matos, L.P.D. Ribeiro, G.S. Lopes, Infrared radiation applied as a heating source in milk sample preparation for the determination of trace elements by inductively coupled plasma-optical emission spectroscopy, *Revista Virtual de Química* 9(6) (2017) 2226-2236.

[63] R.S. Picoloto, M. Doneda, E.L.M. Flores, M.F. Mesko, E.M.M. Flores, P.A. Mello, Simultaneous determination of bromine and iodine in milk powder for adult and infant nutrition by plasma based techniques after digestion using microwave-induced combustion, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 107 (2015) 86-92.

[64] M. Khajeh, Multivariate optimization of microwave-assisted digestion of copper and zinc from powder milk, *Journal of the Brazilian Chemical Society* 23(9) (2012) 1704-1711.

[65] C. Papachristodoulou, M.C. Tsiamou, H. Sakkas, C. Papadopoulou, Determination of minerals in infant milk formulae by energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry, *Journal of Food Composition and Analysis* 72 (2018) 39-47.

[66] J.S.F. Pereira, L.S.F. Pereira, L. Schmidt, C.M. Moreira, J.S. Barin, E.M.M. Flores, Metals determination in milk powder samples for adult and infant nutrition after focused-microwave induced combustion, *Microchemical Journal* 109 (2013) 29-35.

[67] G.C. Brandao, G.D. Matos, S.L. Ferreira, Slurry sampling and high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry using secondary lines for the determination of Ca and Mg in dairy products, *Microchemical Journal* 98(2) (2011) 231-233.

[68] F. Masotti, D. Erba, I. De Noni, L. Pellegrino, Rapid determination of sodium in milk and milk products by capillary zone electrophoresis, *Journal of dairy science* 95(6) (2012) 2872-2881.

[69] K. Judprasong, P. Puwastien, J. Supanuwat, S. Jittinandana, N. Pinprapai, Development of milk powder reference material and its use for evaluation of laboratory performance on analysis of mandatory nutrients for nutrition labelling in Thailand, *Accreditation and Quality Assurance* 22(4) (2017) 207-215.

[70] ISO GUIDE 34. Requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência., **ABNT** (2004) p. 24.

[71] ISO GUIDE 31. Materiais de referência - Conteúdo de certificados e rótulos., **ABNT** (2004) p. 8.

- [72] ISO 13528. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons. International Organization for Standardization, Geneva, 2015, p. p. 66.
- [73] F.G.M. Violante, C.d.O. Rosas, E.d.F. Guimarães, H.d.C. Vital, N.O.C. Zúniga, F.R.d. Aquino Neto, Feasibility study for the development of a certified reference material of nitrofurán metabolites in chicken breast muscle from incurred samples, *Measurement* 129 (2018) 368-374.
- [74] P. Quevauviller, Conclusions of the workshop—improvements of trace element determinations in plant matrices, *Science of The Total Environment* 176(1) (1995) 141-148.
- [75] C.S. Nomura, P.V. Oliveira, Preparação de amostra de fígado bovino e estudo de micro homogeneidade para a determinação de Cd e Pb por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica e amostragem direta de sólido, *Química Nova* 29(2) (2006) 234-239.
- [76] L. Guerrero, B. Camacho, Comparison of different skin preservation methods with gamma irradiation, *Burns* 43(4) (2017) 804-811.
- [77] B.S. Teixeira, R.H.L. Garcia, P.Y.I. Takinami, N.L. del Mastro, Comparison of gamma radiation effects on natural corn and potato starches and modified cassava starch, *Radiation Physics and Chemistry* 142 (2018) 44-49.
- [78] BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento Técnico para Irradiação Alimentos. Resolução - RDC nº 21, de 26 de janeiro de 2001., Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 29 de janeiro de 2001., 2001.
- [79] X. Kong, X. Zhou, Z. Sui, J. Bao, Effects of gamma irradiation on physicochemical properties of native and acetylated wheat starches, *International Journal of Biological Macromolecules* 91 (2016) 1141-1150.
- [80] I. Carvalho Santos, J. Pinto, A.I. Pimenta, J. Madureira, P. Matos, C. Viegas, A. Raposo, F.M.A. Margaça, S. Cabo Verde, Use of gamma radiation in sheep butter manufacturing process for shelf-life extension, *International Dairy Journal* 71 (2017) 43-49.
- [81] R.A. Molins, *Food irradiation: principles and applications*, John Wiley & Sons.2001.
- [82] N. Gong, X. Wang, B. Zhang, Z. Gao, G. Du, Y. Lv, Characterization and uncertainty evaluation of a new certified reference material of baicalein, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 89 (2014) 106-110.
- [83] M.S. Kawamoto, G.B. de Souza, A.R. de Araujo Nogueira, Preparation and evaluation of a new reference material for macro- and micronutrients in fish feed, *Microchemical Journal* 149 (2019) 104027.

- [84] A.M.H. van der Veen, T.P.J. Linsinger, H. Schimmel, A. Lamberty, J. Pauwels, Uncertainty calculations in the certification of reference materials 4. Characterisation and certification, *Accreditation and Quality Assurance* 6(7) (2001) 290-294.
- [85] A.M.H. van der Veen, J. Pauwels, Uncertainty calculations in the certification of reference materials. 1. Principles of analysis of variance, *Accreditation and Quality Assurance* 5(12) (2000) 464-469.
- [86] W.F.d.C. Rocha, R. Nogueira, G.E. Baptista da Silva, S.M. Queiroz, G.F. Sarmanho, A comparison of three procedures for robust PCA of experimental results of the homogeneity test of a new sodium diclofenac candidate certified reference material, *Microchemical Journal* 109 (2013) 112-116.
- [87] J. Sarembaud, R. Pinto, D.N. Rutledge, M. Feinberg, Application of the ANOVA-PCA method to stability studies of reference materials, *Analytica chimica acta* 603(2) (2007) 147-154.
- [88] L. Castro, E.G. Moreira, M.B.A. Vasconcellos, C.N. Lange, T. Pedron, B.L. Batista, Stability assessment of a bovine kidney reference-material candidate, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 317(2) (2018) 1133-1139.
- [89] J. Pauwels, A. Lamberty, H. Schimmel, Quantification of the expected shelf-life of certified reference materials, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 361(5) (1998) 395-399.
- [90] D.F. Andrade, R.C. Machado, E.R. Pereira-Filho, Proposition of electronic waste as a reference material—part 2: homogeneity, stability, characterization, and uncertainties, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 34(12) (2019) 2402-2410.
- [91] A. Lamberty, H. Schimmel, J. Pauwels, The study of the stability of reference materials by isochronous measurements, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 360(3) (1998) 359-361.
- [92] A.M.H. van der Veen, T.P.J. Linsinger, A. Lamberty, J. Pauwels, Uncertainty calculations in the certification of reference materials. 3. Stability study, *Accreditation and Quality Assurance* 6(6) (2001) 257-263.
- [93] S. Grimalt, S. Harbeck, P. Shegunova, J. Seghers, B. Sejerøe-Olsen, H. Emteborg, M. Dabrio, Development of a new cucumber reference material for pesticide residue analysis: feasibility study for material processing, homogeneity and stability assessment, *Analytical and bioanalytical chemistry* 407(11) (2015) 3083-3091.
- [94] T.P.J. Linsinger, A.M.H. van der Veen, B.M. Gawlik, J. Pauwels, A. Lamberty, Planning and combining of isochronous stability studies of CRMs, *Accreditation and Quality Assurance* 9(8) (2004) 464-472.

- [95] T. Yarita, S. Inagaki, T. Yamazaki, M. Kawaguchi, H. Uchida, A. Takatsu, T. Suzuki, Interlaboratory comparison of liquid chromatography-tandem mass spectrometry quantification of diarrhetic shellfish toxins in scallop midgut glands, *Food Chemistry* 252 (2018) 366-372.
- [96] F.E. Grubbs, Procedures for detecting outlying observations in samples, *Technometrics* 11(1) (1969) 1-21.
- [97] P. Rosario, J.L. Martínez, J.M. Silván, Comparison of different statistical methods for evaluation of proficiency test data, *Accreditation and quality assurance* 13(9) (2008) 493-499.
- [98] S. Karthikeyan, R. Balasubramanian, Interlaboratory study to improve the quality of trace element determinations in rainwater, *Analytica chimica acta* 576(1) (2006) 9-16.
- [99] D.F.d. Andrade, A.A. Clemente, V. Harcar, J.L.L.d. Melo, S.E.C. Pereira, L.H.M. Santos, V.S. Ferreira-Leitão, Comparação interlaboratorial para análise de dureza total e cloreto em água, *Química Nova* 33(8) (2010) 1784-1789.
- [100] ISO/IEC 17043: Conformity assessment-General requirements for proficiency testing. International Organization for Standardization, ISO2010.
- [101] W. Youden, Graphical diagnosis of interlaboratory test results, *Journal of Quality Technology* 4(1) (1972) 29-33.
- [102] Q. Zhou, J. Hu, X. Li, S. Li, Z. Gao, J. Xu, W. Xie, Construction and application of the robust Youden plot in an EQA program, *Accreditation and Quality Assurance* 20(3) (2015) 195-201.
- [103] J.C. Olivieri, Programa Interlaboratorial: Proposta de Modelo para Interpretação de Resultados de Análises Químicas. , Dissertação (Mestrado)–Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2004.
- [104] R. Fortes, A. Zuppolini Neto, M. Assali, A. Barbosa Jr, Avaliação de Cinco Anos de Programa Interlaboratorial de Misturas Asfálticas Desenvolvido no Brasil. 35ª Reunião Anual de Pavimentação, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2004.
- [105] VIM. Vocabulário Internacional de Metrologia. **Conceitos fundamentais e gerais e termos associados.** p. 24, 2012. Disponível em: <[http://www.inmetro.gov.br/inovacao/publicacoes/vim\\_2012.pdf](http://www.inmetro.gov.br/inovacao/publicacoes/vim_2012.pdf)>, acesso em agosto de 2018.
- [106] J.C. Ulrich, Preparação e caracterização de um material de referência de peixe, Universidade de São Paulo, 2011.
- [107] S. Ellison, M. Rosslein, A. Willians, Guia EURACHEM/CITAC: Determinando a incerteza na medição analítica, Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Metrologia (2002).

- [108] M.M.C. Ferreira, *Quimiometria: Conceitos, Métodos e Aplicações*, Universidade Estadual de Campinas. Editora da Unicamp 2015.
- [109] R. Bruns, J. Faigle, *Quimiometria, Química Nova* 8(2) (1985) 84-99.
- [110] K.R. Beebe, B.R. Kowalski, An introduction to multivariate calibration and analysis, *Analytical Chemistry* 59(17) (1987) 1007A-1017A.
- [111] N. Kumar, A. Bansal, G.S. Sarma, R.K. Rawal, Chemometrics tools used in analytical chemistry: An overview, *Talanta* 123 (2014) 186-199.
- [112] S.L.C. Ferreira, *Introdução às técnicas de planejamento de experimentos*, Editora Vento Leste, Salvador 2015.
- [113] I.F. dos Santos, A.M.P. dos Santos, U.A. Barbosa, J.S. Lima, D.C. dos Santos, G.D. Matos, Multivariate analysis of the mineral content of raw and cooked okra (*Abelmoschus esculentus* L.), *Microchemical Journal* 110 (2013) 439-443.
- [114] W.F. de Carvalho Rocha, R. Nogueira, Use of multivariate statistical analysis to evaluate experimental results for certification of two pharmaceutical reference materials, *Accreditation and quality assurance* 16(10) (2011) 523.
- [115] D.C. Lima, A.M.P.d. Santos, R.G.O. Araujo, I.S. Scarminio, R.E. Bruns, S.L.C. Ferreira, Principal component analysis and hierarchical cluster analysis for homogeneity evaluation during the preparation of a wheat flour laboratory reference material for inorganic analysis, *Microchemical Journal* 95(2) (2010) 222-226.
- [116] J.M. Neto, G.C. Moita, Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados, *Química nova* 21(4) (1998) 467-469.
- [117] P.R. Correia, M.M. Ferreira, Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos, *Química Nova* 30(2) (2007) 481.
- [118] F.S. Panero, H.E.B. da Silva, Application of exploratory data analysis for the characterization of tubular wells of the North of Brazil, *Microchemical Journal* 88(2) (2008) 194-200.
- [119] A.M.P. dos Santos, L.O. dos Santos, G.C. Brandao, D.J. Leao, A.V.B. Bernedo, R.T. Lopes, V.A. Lemos, Homogeneity study of a corn flour laboratory reference material candidate for inorganic analysis, *Food Chemistry* 178 (2015) 287-291.
- [120] T.T.B. Marchezi, L.V. Vieira, R.C. de Sena, E.V.R. de Castro, G.P. Brandão, M.T.W.D. Carneiro, Preparation of a reference material for crude oil trace elements: Study of homogeneity and stability, *Microchemical Journal* 155 (2020) 104799.

[121] L. Castro, E.G. Moreira, M.B.A. Vasconcellos, Use of INAA in the homogeneity evaluation of a bovine kidney candidate reference material, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 311(2) (2017) 1291-1298.

[122] A.M. Idris, A.A. El-Zahhar, Indicative properties measurements by SEM, SEM-EDX and XRD for initial homogeneity tests of new certified reference materials, *Microchemical Journal* 146 (2019) 429-433.

[123] Labwin - Software para Laboratórios. **Software Labwin-PTS (Testes de Proficiência)**. Disponível em: < <http://www.labwin.com.br> >.

[124] S.O. Souza, V.S. Santos, E.S. Santos, D.V.L. Ávila, C.C. Nascimento, S.S.L. Costa, C.A.B. Garcia, R.G.O. Araujo, Evaluation of the mineral content in milk and yogurt types using chemometric tools, *Microchemical Journal* 143 (2018) 1-8.

[125] A.M. dos Santos, J.S. Lima, I.F. dos Santos, E.F. Silva, F.A. de Santana, D.G. de Araujo, L.O. dos Santos, Mineral and centesimal composition evaluation of conventional and organic cultivars sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) using chemometric tools, *Food chemistry* 273 (2019) 166-171.

[126] T.P.J. Linsinger, J. Pauwels, A. Lamberty, H.G. Schimmel, A.M.H. van der Veen, L. Siekmann, Estimating the uncertainty of stability for matrix CRMs, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 370(2) (2001) 183-188.

[127] T.P.J. Linsinger, J. Pauwels, A.M.H. van der Veen, H. Schimmel, A. Lamberty, Homogeneity and stability of reference materials, *Accreditation and Quality Assurance* 6(1) (2001) 20-25.

[128] S. Yarkin, K. Trzepla, N.P. Hyslop, W.H. White, O. Butler, T. Ancelet, P. Davy, M. Gerboles, S. Kohl, A. McWilliams, Comparison of a priori and interlaboratory-measurement-consensus approaches for value assignment of multi-element reference materials on PTFE filters, *Microchemical Journal* (2020) 105225.

[129] J.H. Lee, Iron-deficiency anemia in children: from diagnosis to treatment, *Journal of the Korean Medical Association* 59(9) (2016) 678-682.

[130] U. Araujo-Barbosa, E. Peña-Vazquez, M.C. Barciela-Alonso, S.L.C. Ferreira, A.M.P. dos Santos, P. Bermejo-Barrera, Simultaneous determination and speciation analysis of arsenic and chromium in iron supplements used for iron-deficiency anemia treatment by HPLC-ICP-MS, *Talanta* 170 (2017) 523-529.

[131] P.M. Brannon, C.L. Taylor, Iron supplementation during pregnancy and infancy: Uncertainties and implications for research and policy, *Nutrients* 9(12) (2017) 1327.

[132] C. Wong, Iron deficiency anaemia, *Paediatrics and Child Health* 27(11) (2017) 527-529.

- [133] R.B. Costello, J.T. Dwyer, R.L. Bailey, Chromium supplements for glycemic control in type 2 diabetes: limited evidence of effectiveness, *Nutrition Reviews* 74(7) (2016) 455-468.
- [134] R. Cama-Moncunill, M.P. Casado-Gavalda, X. Cama-Moncunill, M. Markiewicz-Keszycka, Y. Dixit, P.J. Cullen, C. Sullivan, Quantification of trace metals in infant formula premixes using laser-induced breakdown spectroscopy, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 135 (2017) 6-14.
- [135] M.L. Akele, D. Z. Abebe, A. Kokeb, A. Assefa, A. Madhusudhan, R. De Oliveira, Analysis of trace metal concentrations in raw cow's milk from three dairy farms in North Gondar, Ethiopia: chemometric approach, 2017.
- [136] D. Bakircioglu, N. Topraksever, S. Yurtsever, M. Kizildere, Y.B. Kurtulus, Investigation of macro, micro and toxic element concentrations of milk and fermented milks products by using an inductively coupled plasma optical emission spectrometer, to improve food safety in Turkey, *Microchemical Journal* 136 (2018) 133-138.
- [137] M. Esposito, O. Miedico, S. Cavallo, R. Pellicanò, G. Rosato, L. Baldi, A.E. Chiaravalle, Trace elements in raw milk of buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Campania, Italy, *Food chemistry* 233 (2017) 378-384.
- [138] N. Khan, I.S. Jeong, I.M. Hwang, J.S. Kim, S.H. Choi, E.Y. Nho, J.Y. Choi, K.S. Park, K.S. Kim, Analysis of minor and trace elements in milk and yogurts by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS), *Food chemistry* 147 (2014) 220-224.
- [139] Z. Kowalewska, H. Laskowska, M. Gzylewski, Application of high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry to reveal, evaluate and overcome certain spectral effects in Pb determination of unleaded gasoline, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 132 (2017) 26-36.
- [140] R. Dobrowolski, A. Mróz, M. Dąbrowska, P. Olszański, Solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry for gold determination in geological samples after preconcentration onto carbon nanotubes, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 132 (2017) 13-18.
- [141] N. Laczai, L. Kovács, Á. Péter, L. Bencs, Solid sampling determination of lithium and sodium additives in microsamples of yttrium oxyorthosilicate by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 117 (2016) 8-15.
- [142] H. Tinas, N. Ozbek, S. Akman, Determination of lead in flour samples directly by solid sampling high resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 140 (2018) 73-75.
- [143] S.L. Ferreira, M.A. Bezerra, A.S. Santos, W.N. dos Santos, C.G. Novaes, O.M. de Oliveira, M.L. Oliveira, R.L. Garcia, Atomic absorption spectrometry—A multi element technique, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 100 (2018) 1-6.

- [144] D.G. Filatova, V.V. Eskina, V.B. Baranovskaya, S.A. Vladimirova, A.M. Gaskov, M.N. Romyantseva, Y.A. Karpov, Determination of gold and cobalt dopants in advanced materials based on tin oxide by slurry sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 140 (2018) 1-4.
- [145] J.S. Almeida, G.L. Santos, G.C. Brandão, M.G. Korn, L.S. Teixeira, Multivariate optimization of ultrasound-assisted extraction using Doehlert matrix for simultaneous determination of Fe and Ni in vegetable oils by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Food chemistry* 273 (2019) 130-135.
- [146] W. Boschetti, A.R. Borges, A.T. Duarte, M.B. Dessuy, M.G.R. Vale, J.B. de Andrade, B. Welz, Simultaneous determination of Mo and Ni in wine and soil amendments by HR-CS GF AAS, *Analytical Methods* 6(12) (2014) 4247-4256.
- [147] W. Boschetti, M. Orlando, M. Dullius, M. Dessuy, M. Vale, B. Welz, J. de Andrade, Sequential and simultaneous determination of four elements in soil samples using high-resolution continuum source graphite furnace atomic and molecular absorption spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 31(6) (2016) 1269-1277.
- [148] I.M. Dittert, J.S. Silva, R.G. Araujo, A.J. Curtius, B. Welz, H. Becker-Ross, Direct and simultaneous determination of Cr and Fe in crude oil using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 64(6) (2009) 537-543.
- [149] L.O. Dos Santos, G.C. Brandao, A.M. Dos Santos, S.L. Ferreira, V.A. Lemos, Direct and simultaneous determination of copper and iron in flours by solid sample analysis and high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Food Analytical Methods* 10(2) (2017) 469-476.
- [150] D.J. Leao, M.M. Junior, G.C. Brandao, S.L. Ferreira, Simultaneous determination of cadmium, iron and tin in canned foods using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Talanta* 153 (2016) 45-50.
- [151] N. Ozbek, M. Ozcan, Simultaneous determination of Co, Al and Fe by HR CS-GFAAS, *Talanta* 148 (2016) 17-21.
- [152] M. Pozzatti, F.V. Nakadi, M.G.R. Vale, B. Welz, Simultaneous determination of nickel and iron in vegetables of Solanaceae family using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry and direct solid sample analysis, *Microchemical Journal* 133 (2017) 162-167.
- [153] M. Resano, E. Bolea-Fernández, E. Mozas, M.R. Flórez, P. Grinberg, R.E. Sturgeon, Simultaneous determination of Co, Fe, Ni and Pb in carbon nanotubes by means of solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 28(5) (2013) 657-665.

- [154] A.C. Valdivia, E.V. Alonso, M.L. Guerrero, J. Gonzalez-Rodriguez, J.C. Pavón, A.G. de Torres, Simultaneous determination of V, Ni and Fe in fuel fly ash using solid sampling high resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Talanta* 179 (2018) 1-8.
- [155] E. Zambrzycka-Szelewa, M. Lulewicz, B. Godlewska-Żyłkiewicz, Simultaneous determination of rhodium and ruthenium by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 133 (2017) 81-87.
- [156] A.S. Santos, L.O. dos Santos, I.F. dos Santos, K.R. dos Santos, S.L. Ferreira, Application of chemometric tools for homogeneity and stability evaluation during the preparation of a powdered milk laboratory reference material for inorganic analysis, *Analytical Methods* 12(8) (2020) 1055-1063.
- [157] D.G. da Silva, M.M. Junior, L.O. Silva, L.A. Portugal, G.D. Matos, S.L. Ferreira, Determination of cadmium in rice by electrothermal atomic absorption spectrometry using aluminum as permanent modifier, *Analytical Methods* 3(11) (2011) 2495-2500.
- [158] S.L.C. Ferreira, L.A. Portugal, G.D. Matos, D.G. da Silva, R.M. de Jesus, G.B. Brito, Aluminium as chemical modifier for the determination of lead in sugar cane spirits using electrothermal atomic absorption spectrometry, *Analytical Methods* 3(5) (2011) 1168-1171.
- [159] B. Welz, H. Becker-Ross, S. Florek, U. Heitmann, *High-Resolution Continuum Source AAS: The Better Way to Do Atomic Absorption Spectrometry*, Wiley 2006.
- [160] U. Heitmann, B. Welz, D.L. Borges, F.G. Lepri, Feasibility of peak volume, side pixel and multiple peak registration in high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 62(11) (2007) 1222-1230.
- [161] C. Kira, F. D. Maio, V. Maihara, Comparison of Partial Digestion Procedures for Determination of Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, and Zn in Milk by Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry, 2004.
- [162] I. REHANA, W. YAWAR, Determination of inorganic elements in milk powder using wavelength dispersive X-ray fluorescence spectrometer, *International journal of dairy technology* 65(1) (2012) 98-103.

## 6. APÊNDICE A

**Tabela 18** – Concentração dos elementos de interesse na amostra de leite em pó para o estudo da massa mínima, após decomposição ácida e quantificação por ICP OES (média ± desvio padrão, n = 3)

<b>Massa</b>	<b>Concentração (mg g<sup>-1</sup>)</b>						
<b>(mg)</b>	<b>Ca</b>	<b>Fe</b>	<b>K</b>	<b>Mg</b>	<b>Na</b>	<b>P</b>	<b>Zn</b>
100	9,2600	0,1151	12,8070	0,8653	3,0024	6,1065	0,0325
100	8,7374	0,1075	12,0144	0,8214	2,8286	5,5306	0,0305
100	8,9421	0,1106	12,3500	0,8432	2,9155	5,8093	0,0372
<b>Média</b>	<b>8,9798</b>	<b>0,1111</b>	<b>12,3905</b>	<b>0,8433</b>	<b>2,9155</b>	<b>5,8154</b>	<b>0,0334</b>
<b>Desvio</b>	<b>0,2633</b>	<b>0,0038</b>	<b>0,3978</b>	<b>0,0219</b>	<b>0,0869</b>	<b>0,2880</b>	<b>0,0035</b>
200	9,3419	0,1121	13,9590	0,8555	3,0889	7,3319	0,0318
200	9,3620	0,1143	13,8212	0,8548	3,0957	7,3219	0,0318
200	9,3796	0,1139	13,8400	0,8520	3,0834	7,3356	0,0325
<b>Média</b>	<b>9,3612</b>	<b>0,1134</b>	<b>13,8734</b>	<b>0,8541</b>	<b>3,0893</b>	<b>7,3298</b>	<b>0,0320</b>
<b>Desvio</b>	<b>0,0189</b>	<b>0,0012</b>	<b>0,0747</b>	<b>0,0019</b>	<b>0,0062</b>	<b>0,0071</b>	<b>0,0004</b>
250	9,1411	0,1117	14,3100	0,8477	3,1638	7,6270	0,0318
250	9,1398	0,1123	14,3858	0,8534	3,2018	7,6641	0,0313
250	9,1431	0,1135	14,2910	0,8477	3,2207	7,6708	0,0314
<b>Média</b>	<b>9,1413</b>	<b>0,1125</b>	<b>14,3289</b>	<b>0,8496</b>	<b>3,1954</b>	<b>7,6540</b>	<b>0,0315</b>
<b>Desvio</b>	<b>0,0017</b>	<b>0,0009</b>	<b>0,0502</b>	<b>0,0033</b>	<b>0,0290</b>	<b>0,0236</b>	<b>0,0003</b>
300	9,2076	0,1098	14,3294	0,8211	3,1375	7,6353	0,0313
300	9,2310	0,1094	14,2328	0,8120	3,1185	7,6305	0,0327
300	9,3103	0,1119	14,4173	0,8286	3,1909	7,7696	0,0321
<b>Média</b>	<b>9,2496</b>	<b>0,1104</b>	<b>14,3265</b>	<b>0,8206</b>	<b>3,1490</b>	<b>7,6784</b>	<b>0,0320</b>
<b>Desvio</b>	<b>0,0539</b>	<b>0,0014</b>	<b>0,0923</b>	<b>0,0084</b>	<b>0,0375</b>	<b>0,0789</b>	<b>0,0007</b>

Fonte: Autor (2020).

**Tabela 19** - Concentração dos elementos de interesse na amostra de leite em pó para o estudo da homogeneidade intra-frasco, após decomposição ácida e quantificação por ICP OES (média ± desvio padrão, n = 10)

Nº. da Amostra	Concentração (mg g <sup>-1</sup> )						
	Ca	Fe	K	Mg	Na	P	Zn
29.1	9,6433	0,1162	14,7813	0,8726	3,2706	7,9511	0,0328
29.2	9,3439	0,1158	14,2102	0,8412	3,1409	7,6609	0,0315
29.3	9,1702	0,1121	14,1868	0,8430	3,1342	7,5779	0,0314
29.4	8,9206	0,1072	13,9343	0,8260	3,0634	7,3951	0,0305
29.5	9,7413	0,1187	15,3732	0,9047	3,3910	8,1935	0,0335
29.6	9,6536	0,1236	14,8805	0,8747	3,2848	7,9784	0,0328
29.7	9,1411	0,1121	14,3289	0,8496	3,1954	7,6540	0,0313
29.8	9,2430	0,1136	14,3660	0,8548	3,1903	7,7024	0,0318
29.9	9,0063	0,1082	13,8966	0,8253	3,0663	7,4266	0,0305
29.10	9,2625	0,1132	14,2024	0,8431	3,1688	7,6433	0,0311
<b>Média</b>	<b>9,3126</b>	<b>0,1141</b>	<b>14,4160</b>	<b>0,8535</b>	<b>3,1906</b>	<b>7,7183</b>	<b>0,0317</b>
<b>Desvio</b>	<b>0,2819</b>	<b>0,0048</b>	<b>0,4616</b>	<b>0,0244</b>	<b>0,1018</b>	<b>0,2517</b>	<b>0,0010</b>

Fonte: Autor (2020).

**Tabela 20** - Concentração dos elementos de interesse na amostra de leite em pó para o estudo da homogeneidade entre frascos, após decomposição ácida e quantificação por ICP OES (média ± desvio padrão, n = 3)

Nº. da Amostra	Concentração (mg g <sup>-1</sup> )						
	Ca	Fe	K	Mg	Na	P	Zn
89.1	8,7812	0,1041	12,9050	0,7882	2,8855	7,0301	0,0295
89.2	8,8003	0,1045	13,1537	0,7882	2,8855	7,0375	0,0293
89.3	8,8003	0,1046	13,0580	0,7901	2,8855	7,0369	0,0295
88.1	8,7377	0,1048	13,0597	0,7952	2,9093	7,0004	0,0297
88.2	8,7760	0,1054	13,0405	0,7971	2,9093	7,0393	0,0297
88.3	8,7569	0,1052	13,1172	0,7971	2,8901	7,0392	0,0297
19.1	9,0704	0,1059	13,6630	0,8038	3,0390	7,3266	0,0304
19.2	8,9577	0,1048	13,6066	0,8019	3,0014	7,2564	0,0302
19.3	8,9014	0,1044	13,5315	0,7981	3,0202	7,2599	0,0300
21.1	8,9618	0,1110	13,5201	0,7968	3,0158	7,2750	0,0308
21.2	9,0000	0,1114	13,7494	0,8102	3,0349	7,3009	0,0310

**Tabela 20 - continuação** - Concentração dos elementos de interesse na amostra de leite em pó para o estudo da homogeneidade entre frascos, após decomposição ácida e quantificação por ICP OES (média  $\pm$  desvio padrão, n = 3)

21.3	9,0000	0,1116	13,6348	0,8025	3,0540	7,3313	0,0311
53.1	9,1492	0,1115	13,8968	0,8156	3,0528	7,3907	0,0309
53.2	9,1683	0,1115	13,7631	0,8118	3,0719	7,4121	0,0309
53.3	9,1683	0,1115	13,7631	0,8118	3,0910	7,4099	0,0309
7.1	9,1976	0,1109	14,0561	0,8240	3,0625	7,4292	0,0312
7.2	9,2168	0,1115	13,9220	0,8182	3,0817	7,4984	0,0314
7.3	9,2743	0,1117	13,9986	0,8240	3,1200	7,5065	0,0314
109.1	9,2762	0,1114	14,1248	0,8267	3,1015	7,5212	0,0310
109.2	9,2762	0,1114	14,2772	0,8324	3,1205	7,5555	0,0310
109.3	9,2952	0,1118	14,3343	0,8362	3,1396	7,5731	0,0310
48.1	9,3008	0,1122	13,9715	0,8208	3,1033	7,5255	0,0311
48.2	9,3775	0,1131	14,1632	0,8304	3,1225	7,5805	0,0315
48.3	9,4159	0,1135	14,2016	0,8284	3,1033	7,5936	0,0315
69.1	9,4163	0,1118	14,2115	0,8344	3,1546	7,6119	0,0312
69.2	9,4354	0,1118	14,1733	0,8344	3,1737	7,6324	0,0314
69.3	9,3206	0,1118	14,1541	0,8325	3,1929	7,6355	0,0314
60.1	8,6941	0,1033	13,1382	0,7926	2,8947	6,9753	0,0290
60.2	8,6941	0,1033	12,9846	0,7888	2,8947	6,9509	0,0290
60.3	8,6749	0,1033	13,1190	0,7926	2,9139	6,9765	0,0290
33.1	9,2461	0,1122	14,2602	0,8333	3,1168	7,5242	0,0316
33.2	9,3032	0,1134	14,1080	0,8314	3,1548	7,6162	0,0318
33.3	9,3603	0,1138	14,2983	0,8371	3,1739	7,6328	0,0320
<b>Média</b>	<b>9,0850</b>	<b>0,1092</b>	<b>13,7260</b>	<b>0,8129</b>	<b>3,0415</b>	<b>7,3480</b>	<b>0,0306</b>
<b>Desvio</b>	<b>0,2507</b>	<b>0,0038</b>	<b>0,4692</b>	<b>0,0171</b>	<b>0,1012</b>	<b>0,2382</b>	<b>0,0009</b>

Fonte: Autor (2020).

**Tabela 21** - Concentração dos elementos de interesse na amostra de leite em pó para o estudo de estabilidade, após decomposição ácida e quantificação por ICP OES (média  $\pm$  desvio padrão, n = 3)

N°.	Temperatura	Concentração (mg g <sup>-1</sup> )						
	/tempo	Ca	Fe	K	Mg	Na	P	Zn
0	-10/1	9,3008	0,1122	13,9715	0,8208	3,3751	7,5255	0,0311
	-10/1	9,3775	0,1131	14,1632	0,8304	3,3943	7,5805	0,0315
	-10/1	9,4159	0,1135	14,2016	0,8284	3,4435	7,5936	0,0315
	25/1	9,2461	0,1122	14,2602	0,8333	3,3864	7,5242	0,0316
	25/1	9,3032	0,1134	14,1080	0,8314	3,4245	7,6162	0,0318
	25/1	9,3603	0,1138	14,2983	0,8371	3,4435	7,6328	0,0320
	40/1	9,4163	0,1118	14,2115	0,8344	3,4258	7,9879	0,0312
	40/1	9,4354	0,1118	14,1733	0,8344	3,4450	7,6324	0,0314
	40/1	9,3206	0,1118	14,1541	0,8325	3,4641	7,6355	0,0314
	<b>Média</b>	<b>9,3529</b>	<b>0,1126</b>	<b>14,1713</b>	<b>0,8314</b>	<b>3,4225</b>	<b>7,6365</b>	<b>0,0315</b>
	<b>Desvio</b>	<b>0,0643</b>	<b>0,0008</b>	<b>0,0941</b>	<b>0,0047</b>	<b>0,0306</b>	<b>0,1387</b>	<b>0,0003</b>
1	-10/5	10,0555	0,1132	13,1874	0,8699	4,0033	7,9879	0,0325
	-10/5	10,0082	0,1125	13,1401	0,8657	4,0033	8,0161	0,0325
	-10/5	10,0413	0,1125	13,1639	0,8661	3,9892	7,9831	0,0325
	25/5	9,9207	0,1088	12,7117	0,8398	3,8269	7,7099	0,0318
	25/5	9,8928	0,1078	12,8047	0,8398	3,8175	7,6343	0,0313
	25/5	9,8207	0,1075	12,6489	0,8328	3,8124	7,6291	0,0314
	40/5	9,8295	0,1099	12,8480	0,8509	3,8789	7,7769	0,0316
	40/5	9,7541	0,1084	12,7540	0,8434	3,8695	7,7200	0,0311
	40/5	9,7403	0,1087	12,7263	0,8410	3,8272	7,7200	0,0311
	<b>Média</b>	<b>9,8959</b>	<b>0,1099</b>	<b>12,8872</b>	<b>0,8499</b>	<b>3,8920</b>	<b>7,7975</b>	<b>0,0318</b>
	<b>Desvio</b>	<b>0,1195</b>	<b>0,0022</b>	<b>0,2151</b>	<b>0,0138</b>	<b>0,0831</b>	<b>0,1556</b>	<b>0,0006</b>
2	-10/8	9,7419	0,1354	12,5609	1,0510	3,9529	9,4953	0,0330
	-10/8	9,6201	0,1290	12,5314	0,9244	4,1555	8,3423	0,0363
	-10/8	9,6246	0,1083	12,6940	0,8693	3,9895	8,0167	0,0364
	25/8	9,6281	0,1288	13,4307	1,0105	4,3266	9,0842	0,0387
	25/8	9,2667	0,1107	12,5482	0,8878	3,9905	7,9480	0,0336
	25/8	9,3835	0,1038	12,1334	0,8425	3,7877	7,5801	0,0316
	40/8	9,6319	0,1201	13,1052	0,9276	4,1849	8,3644	0,0356
	40/8	9,5754	0,1118	12,6144	0,8793	3,9785	7,9383	0,0336

**Tabela 21 – continuação** - Concentração dos elementos de interesse na amostra de leite em pó para o estudo de estabilidade, após decomposição ácida e quantificação por ICP OES (média ± desvio padrão, n = 3)

	<b>40/8</b>	9,8427	0,1075	12,6144	0,8658	3,8896	7,8171	0,0329
	<b>Média</b>	<b>9,5905</b>	<b>0,1173</b>	<b>12,6925</b>	<b>0,9176</b>	<b>4,0284</b>	<b>8,2874</b>	<b>0,0346</b>
	<b>Desvio</b>	<b>0,1731</b>	<b>0,0114</b>	<b>0,3715</b>	<b>0,0703</b>	<b>0,1650</b>	<b>0,6260</b>	<b>0,0023</b>
	<b>-10/11</b>	8,3797	0,0985	10,8659	0,8057	3,2433	7,0046	0,0284
	<b>-10/11</b>	8,3890	0,0985	10,9564	0,8100	3,2574	7,0046	0,0284
	<b>-10/11</b>	8,4237	0,0988	11,0043	0,8123	3,2574	7,0173	0,0285
	<b>25/11</b>	8,5896	0,1001	10,9446	0,8089	3,2598	7,0571	0,0286
<b>3</b>	<b>25/11</b>	8,5850	0,1002	10,9211	0,8079	3,2594	7,0526	0,0286
	<b>25/11</b>	8,6139	0,1003	10,9796	0,8105	3,2645	7,0710	0,0287
	<b>40/11</b>	8,5770	0,0986	10,9914	0,8125	3,2815	7,0898	0,0284
	<b>40/11</b>	8,6095	0,0988	11,0338	0,8143	3,2876	7,1060	0,0284
	<b>40/11</b>	8,6036	0,0988	11,1119	0,8179	3,2714	7,1044	0,0284
	<b>Média</b>	<b>8,5301</b>	<b>0,0992</b>	<b>10,9788</b>	<b>0,8111</b>	<b>3,2647</b>	<b>7,0564</b>	<b>0,0285</b>
	<b>Desvio</b>	<b>0,1009</b>	<b>0,0008</b>	<b>0,0701</b>	<b>0,0036</b>	<b>0,0136</b>	<b>0,0403</b>	<b>0,0001</b>
	<b>-10/14</b>	8,4645	0,0925	11,0965	0,7578	3,3509	6,6277	0,0286
	<b>-10/14</b>	8,4841	0,0927	11,0572	0,7556	3,3632	6,6431	0,0287
	<b>-10/14</b>	8,4684	0,0929	10,9587	0,7526	3,3567	6,6561	0,0287
	<b>25/14</b>	8,4529	0,0921	11,1960	0,7608	3,3618	6,6113	0,0291
<b>4</b>	<b>25/14</b>	8,4609	0,0922	11,1724	0,7608	3,3697	6,6297	0,0291
	<b>25/14</b>	8,4792	0,0924	11,2270	0,7631	3,3592	6,6375	0,0291
	<b>40/14</b>	8,6364	0,0952	11,1803	0,7634	3,3965	6,7003	0,0293
	<b>40/14</b>	8,6277	0,0951	11,1796	0,7623	3,3845	6,6886	0,0293
	<b>40/14</b>	8,6512	0,0951	11,1719	0,7614	3,3981	6,7052	0,0293
	<b>Média</b>	<b>8,5250</b>	<b>0,0933</b>	<b>11,1377</b>	<b>0,7597</b>	<b>3,3712</b>	<b>6,6555</b>	<b>0,0290</b>
	<b>Desvio</b>	<b>0,0857</b>	<b>0,0013</b>	<b>0,0848</b>	<b>0,0037</b>	<b>0,0175</b>	<b>0,0344</b>	<b>0,0003</b>
	<b>-10/17</b>	9,3674	0,1048	12,5464	0,8632	3,5663	7,1791	0,0313
	<b>-10/17</b>	9,3620	0,1049	12,6027	0,8643	3,5784	7,2333	0,0315
	<b>-10/17</b>	9,3168	0,1053	12,5677	0,8702	3,5898	7,2391	0,0316
<b>5</b>	<b>25/17</b>	9,0440	0,1037	12,5433	0,8540	3,5178	7,0491	0,0312
	<b>25/17</b>	9,1157	0,1042	12,5861	0,8635	3,5912	7,0715	0,0313
	<b>25/17</b>	9,0889	0,1046	12,6622	0,8652	3,5898	7,1025	0,0314

**Tabela 21 – continuação** - Concentração dos elementos de interesse na amostra de leite em pó para o estudo de estabilidade, após decomposição ácida e quantificação por ICP OES (média ± desvio padrão, n = 3)

	<b>40/17</b>	8,9090	0,1044	12,6323	0,8470	3,5391	6,9731	0,0303
	<b>40/17</b>	8,9004	0,1045	12,6097	0,8502	3,5476	6,9588	0,0303
	<b>40/17</b>	8,8783	0,1045	12,6062	0,8526	3,5671	6,9819	0,0303
	<b>Média</b>	<b>9,1092</b>	<b>0,1045</b>	<b>12,5952</b>	<b>0,8589</b>	<b>3,5652</b>	<b>7,0876</b>	<b>0,0310</b>
	<b>Desvio</b>	<b>0,1986</b>	<b>0,0004</b>	<b>0,0390</b>	<b>0,0080</b>	<b>0,0257</b>	<b>0,1092</b>	<b>0,0005</b>
	<b>-10/20</b>	8,7171	0,0997	11,8939	0,8141	3,3016	6,2485	0,0292
	<b>-10/20</b>	8,7294	0,1001	11,9223	0,8154	3,3152	6,2848	0,0292
	<b>-10/20</b>	8,7728	0,1000	12,0104	0,8161	3,3050	6,2870	0,0290
	<b>25/20</b>	8,7506	0,0986	11,9543	0,8115	3,2836	6,2415	0,0300
<b>6</b>	<b>25/20</b>	8,7818	0,0999	12,2296	0,8137	3,2987	6,2521	0,0297
	<b>25/20</b>	8,9642	0,1030	12,0104	0,8274	3,3535	6,3304	0,0297
	<b>40/20</b>	8,9512	0,0994	12,1323	0,8269	3,3590	6,3677	0,0298
	<b>40/20</b>	8,9810	0,0988	12,0638	0,8224	3,3447	6,3564	0,0296
	<b>40/20</b>	9,0097	0,0990	12,1451	0,8236	3,3317	6,3923	0,0297
	<b>Média</b>	<b>8,8509</b>	<b>0,0999</b>	<b>12,0402</b>	<b>0,8190</b>	<b>3,3215</b>	<b>6,3067</b>	<b>0,0296</b>
	<b>Desvio</b>	<b>0,1218</b>	<b>0,0013</b>	<b>0,1120</b>	<b>0,0061</b>	<b>0,0268</b>	<b>0,0565</b>	<b>0,0003</b>

Fonte: Autor (2020).

**Tabela 22** - Laboratórios participantes do estudo interlaboratorial durante a preparação do MRL de leite em pó

---

Laboratório de Química Analítica - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) – Campus Jequié – BA, Brasil
Grupo de Análise Instrumental Aplicada - Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, SP, Brasil.
Laboratório de Química Analítica Ambiental - Universidade Federal de Sergipe (UFS) – Campus São Cristóvão, SE, Brasil.
Laboratório de Análise Traço - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.
LEPETRO - Universidade Federal da Bahia (UFBA) – Instituto de Geociências, Salvador, BA, Brasil.
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN – CNEN, São Paulo, SP, Brasil.
Group of Analytical Chemistry, Automation and Environment - University of the Balearic Islands (UIB), Palma de Mallorca, Spain.
Laboratório de Metrologia Química - Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brasil.
Grupo de Pesquisa em Química e Quimiometria - Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, BA, Brasil. Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP, Brasil.
Laboratório de Química Analítica Aplicada - Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus, BA, Brasil.
Laboratório de Espectrometria Atômica - Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto, MG, Brasil.
Grupo de Espectrometria Analítica Aplicada - Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém, PA, Brasil.
Grupo de Investigação, desenvolvimento e Inovação Analítica - Universidade Federal da Bahia (UFBA) – Instituto de Química, Salvador, BA, Brasil.
Instituto de Química e Biotecnologia - Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Maceió, AL, Brasil.

---

Fonte: Autor (2020).

**Tabela 23** – Resultados fornecidos pelos laboratórios participantes do estudo interlaboratorial

Nº Lab.	Nº Amostra	Concentração (mg g <sup>-1</sup> )						
		Ca	Fe	K	Mg	Na	P	Zn
1	70	2,1816	0,1577	0,8912	2,5602	0,0080		0,0682
	99	1,9089	0,1991	0,9901	2,5641	0,0084		0,0688
2	22	9,0000	0,0920	13,0000	0,8200	4,1000	9,0000	0,0250
	73	8,0000	0,0920	11,0000	0,8000	4,0000	8,0000	0,0244
3	93	6,5748	0,0957	16,3141	0,7865	2,9368		0,0302
4	3			11,2054	0,8534	3,6356		
	116			9,7178	0,7826	3,3479		
5	65	8,7149	0,1141	9,6515	0,8736	3,0241	7,3635	0,0275
	118	8,8461	0,1142	9,9389	0,8882	3,0931	7,5864	0,0283
6	6	7,3240	0,0951	12,7900	0,8580	3,6870		0,0304
	80	8,0940	0,1050	11,2990	0,8560	3,5990		0,0329
7	39	11,1720	0,1050	10,2590	0,9220	4,0980		0,0367
	85	11,5100	0,1080	11,1520	0,9420	4,1660		0,0374
8	9	11,3400	0,1200	15,1910	1,1380	5,8710		0,0291
	84	9,3130	0,1130	14,3200	0,9800	4,6470		0,0241
9	90	10,5795	0,1216	13,1092	0,9032	4,2000	8,5117	0,0361
	108	10,0089	0,1121	13,0847	0,9027	4,2000	8,4135	0,0344
10	20	9,4767	0,1245	13,0333	0,8587	4,1967	7,5167	0,0327
	101	9,2833	0,1240	12,6667	0,7483	4,0200	7,3067	0,0318
11	14	9,6127	0,1053	12,1893	0,8487	3,4840	7,2765	0,0317
	115	9,2347	0,1038	11,8559	0,8399	3,4381	6,9981	0,0311
12	5	3,1484	0,0576	1,0711		0,5057	3,9619	0,0422
	34	2,9458	0,0565	1,0377		0,4844	3,7595	0,0384
13	35	8,6663	0,1134	10,4507	0,7165	3,2490		0,0376
	111	8,6553	0,1156	10,6583	0,7715	3,3383		0,0382
14	27	9,0163	0,0902	5,0987	0,7922	3,3980	10,0923	0,0305
	102	8,6413	0,0837	4,9146	0,7562	3,2159	10,2201	0,0285
15	49		1,7045		0,2651	0,6775	36,1511	
	68		1,7083		0,2804	0,6739	35,7392	
16	37	0,0516			0,0060		0,0960	0,0004
	94	0,0525			0,0059		0,1114	0,0004

Fonte: Autor (2020).

**Tabela 24** – Resultados excluídos após avaliação estatística através dos testes de Grubbs e Cochran

		Elementos						
Lab.	Nº amostra	Ca	Fe	K	Mg	Na	P	Zn
1	70	-	-	-	*G	-	-	*G
	99	-	-	-	*G	-	-	*G
2	22	-	-	-	-	-	-	-
	73	-	-	-	-	-	-	-
3	93	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-
4	3	-	-	-	-	-	-	-
	116	-	-	-	-	-	-	-
5	65	-	-	-	-	-	-	-
	118	-	-	-	-	-	-	-
6	6	-	-	-	-	-	-	-
	80	-	-	-	-	-	-	-
7	39	-	-	-	-	-	-	-
	85	-	-	-	-	-	-	-
8	9	-	-	-	-	-	-	-
	84	-	-	-	-	-	-	-
9	90	-	-	-	-	*C	-	-
	108	-	-	-	-	-	-	-
10	20	-	-	-	-	-	-	-
	101	-	-	-	-	-	-	-
11	14	-	-	-	-	-	-	-
	115	-	-	-	-	-	-	-
12	5	-	-	-	-	-	-	*C
	34	-	-	-	-	-	-	-
13	35	-	-	-	-	-	-	-
	111	-	-	-	-	-	-	-
14	27	-	-	-	-	-	-	-
	102	-	-	-	-	-	-	-
15	49	-	*G,*C	-	-	-	*G	-
	68	-	*G	-	-	-	*G	-
16	37	-	-	-	-	-	-	-
	94	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: Autor (2020). \*G – Grubbs; \*C – Cochran; \*Nível de confiança de 95%.

## 7. APÊNDICE B

### ✚ Artigos completos publicados em periódicos (período 2016-2020)

✓ **SANTOS, ADILSON S.**; DOS SANTOS, LIZ O.; DOS SANTOS, IVANICE F.; DOS SANTOS, KELLY R.; FERREIRA, SERGIO L. C. Application of chemometric tools for homogeneity and stability evaluation during the preparation of a powdered milk laboratory reference material for inorganic analysis. *Analytical Methods JCR*, v. 12, p. 1055-1063, 2020.

✓ BRITO, GEYSA BARRETO; DA SILVA JÚNIOR, JUCELINO BALBINO; DIAS, LUISE CARVALHO; **DE SANTANA SANTOS, ADILSON**; HADLICH, GISELE MARA; FERREIRA, SÉRGIO LUÍS COSTA. Evaluation of the bioavailability of potentially toxic metals in surface sediments collected from a tropical river near an urban area. *MARINE POLLUTION BULLETIN JCR*, v. 156, p. 111215, 2020.

✓ ALMEIDA, LUCAS CINTRA; DA SILVA JÚNIOR, JUCELINO BALBINO; DOS SANTOS, IVANICE FERREIRA; DE CARVALHO, VANESSA SALES; **DE SANTANA SANTOS, ADILSON**; HADLICH, GISELE MARA; FERREIRA, SÉRGIO LUÍS COSTA. Assessment of toxicity of metals in river sediments for human supply: Distribution, evaluation of pollution and sources identification. *MARINE POLLUTION BULLETIN JCR*, v. 158, p. 111423, 2020.

✓ **SANTANA SANTOS, ADILSON**; OLIVEIRA DOS SANTOS, LIZ; PEREIRA JUNIOR, JOAO B.; DE OLIVEIRA, FERNANDO M.; FERREIRA, SERGIO L.C. Development of reference material from powdered milk: uncertainties and interlaboratory evaluation through confidence ellipses. *MICROCHEMICAL JOURNAL JCR*, v. 159, p. 105330, 2020.

✓ **SANTOS, ADILSON S.**; DE SOUZA, CHEILANE T.; LEO, DANILO J.; CORREIA, FELIPO O.; ALMEIDA, TARCÍSIO S.; FERREIRA, SERGIO L. C. Simultaneous Determination of Chromium and Iron in Powdered Milk Using High-Resolution Continuum Source Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. *Food Analytical Methods JCR*, v. 13, p. 284-290, 2019.

✓ FERREIRA, SERGIO L.C.; BEZERRA, MARCOS A.; **SANTOS, ADILSON S.**; DOS SANTOS, WALTER N.L.; NOVAES, CLEBER G.; DE OLIVEIRA, OLIVIA M.C.; OLIVEIRA, MICHAEL L.; GARCIA, RUI L. Atomic absorption spectrometry - A multi element technique. *TRAC-TRENDS IN ANALYTICAL CHEMISTRY JCR*, v. 100, p. 1-6, 2018.

✓ FERREIRA, SERGIO L.C.; SILVA JUNIOR, MARIO M.; FELIX, CAIO S.A.; DA SILVA, DANIEL L.F.; **SANTOS, ADILSON S.**; SANTOS NETO, JOÃO H.; DE SOUZA, CHEILANE T.; CRUZ JUNIOR, RAINELDES A.; SOUZA, ANDERSON S. Multivariate optimization techniques in food analysis - A review. *FOOD CHEMISTRY JCR*, v. 273, p. 3-8, 2017.