

## **Estimativa da incerteza de um material de referência para ensaios de proficiência para a determinação de mercúrio total em pescado *in natura***

### **Estimation of uncertainty of a reference material for proficiency testing for the determination of total mercury in fish *in natura***

**L V Santana<sup>1</sup>, J E S Sarkis<sup>1</sup>, J C Ulrich<sup>1</sup>, M A Hortellani<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN / CNEN - SP), Av. Professor Lineu Prestes 2242, 05508-000 São Paulo, SP

[santana-luciana@ig.com.br](mailto:santana-luciana@ig.com.br); [jesarkis@ipen.br](mailto:jesarkis@ipen.br); [jculrich@ipen.br](mailto:jculrich@ipen.br); [mahortel@ipen.br](mailto:mahortel@ipen.br)

**Resumo:** Este estudo apresenta a estimativa da incerteza para caracterização, estudo de homogeneidade e estudo de estabilidade obtida na preparação de um material de referência para a determinação de mercúrio total em tecido muscular de peixe *in natura* para ensaios de proficiência. Os resultados do teste de estabilidade foram obtidos por regressão linear e para o estudo de homogeneidade foram obtidos por ANOVA-fator único e mostraram que o material é homogêneo e estável. O valor de concentração de mercúrio total com incerteza expandida para o material foi  $0,294 \pm 0,089 \mu\text{g g}^{-1}$ .

**Palavras-chave:** peixes, mercúrio, irradiação, teste de proficiência.

**Abstract:** This study presents the uncertainty estimate for characterization, study of homogeneity and stability study obtained in the preparation of a reference material for the determination of total mercury in fish fresh muscle tissue for proficiency testing. The test results for stability were obtained by linear regression and to homogeneity study was obtained by ANOVA-one way showed that the material is homogeneous and stable. The value of total mercury concentration with expanded uncertainty for the material was  $0,294 \pm 0,089 \mu\text{g g}^{-1}$ .

**Keywords:** fish, mercury, radiation, proficiency test.

## **1. INTRODUÇÃO**

A base para a determinação dos valores de propriedade de um material de referência, se inicia com a conversão de dados do estudo de homogeneidade, estabilidade e caracterização em incertezas padrão de medição, e em geral estes valores são obtidos utilizando-se o Guia para a Expressão da Incerteza de Medição (GUM) [1].

A caracterização de um material de referência é definida como o conjunto completo de medições, o qual estabelece, os valores de suas propriedades, e não apenas suas incertezas, atribuindo um valor de propriedade para o lote de material ou para as unidades individuais. São adotadas diferentes maneiras para a caracterização do material desde que os métodos de medição sejam rastreáveis às referências

especificadas no planejamento do projeto. As abordagens principais são [1, 2]:

1-caracterização por um método individual;

2-caracterização por diferentes métodos e/ou diversos laboratórios.

O estudo de homogeneidade é necessário para demonstrar que o material produzido é suficientemente homogêneo. Esse é realizado entre os frascos e dentro de cada frasco para verificar se existe uma variabilidade no material que possa afetar a propriedade que se deseja determinar [2, 3].

O estudo de estabilidade realizado em curto prazo tem como objetivo verificar as condições normais de transporte, desse modo são selecionadas temperaturas extremas e ideais em períodos curtos de tempo (3-6 meses) que irão simular os níveis de degradação que podem afetar o estado dos valores de propriedades de interesse. Neste caso se apresenta como o estudo ideal para amostras de ensaios de proficiência de matrizes biológicas [2, 3, 4].

Neste trabalho serão descritos os cálculos referentes à incerteza de caracterização, incerteza de homogeneidade e incerteza de estabilidade em curto prazo, para obtenção dos valores de referência para um material destinado a ensaios de proficiência para determinação de mercúrio total em tecido muscular de peixe *in natura*.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1. Preparação do material

Foram utilizados 2 peixes com 660 g e 589 g, respectivamente, adquiridos na cidade de Itaituba, região Amazônica próximo ao rio Tapajós. Os peixes foram limpos, removendo-se cabeça, rabo, vísceras e pele, usando uma faca de aço inox. O tecido muscular foi filetado e triturado em um multiprocessador doméstico marca (Walita ®) e após foi homogeneizado em uma batedeira doméstica marca (Walita ®) com pás tipo “fouet” por 10 minutos, resultando em 1100 g [5]. O material foi envasado em 86 sachês de 15 g cada. Em seguida, foram separados aleatoriamente 43 sachês para serem irradiados em um ciclotron (Cyclone Applications ion beam 30), no Centro

de Tecnologia das Radiações do IPEN, com  $10,0 \pm 1,05$  kGy utilizando uma fonte de cobalto  $^{60}\text{Co}$  à temperatura de  $24 \pm 4$  °C para os estudos de homogeneidade e estabilidade.

### 2.2 Determinação de Mercúrio total

Foram digeridas 0,5 g de amostra com 1 mL de  $\text{HNO}_3$ , 2 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e 1 mL,  $\text{HClO}_4$ , em chapa sob uma temperatura de 110 ° C por 30 minutos. Após a digestão, a solução foi diluída com 20 mL de água deionizada para análise [6].

A Determinação de Mercúrio total foi realizada por meio da técnica de espectrofotometria de absorção atômica com geração de vapor frio e injeção em fluxo (FIA-CV-AAS), utilizando um espectrofotômetro de absorção atômica modelo AA-220 Varian FS, de acordo com as especificações do fabricante. O agente redutor utilizado foi  $\text{SnCl}_2$  25% (w / v) em  $\text{HCl}$  25% (v / v) [6].

O material de referência certificado DORM-2 - "Dogfish" fornecido pelo National Reserch Conciul of Canada (NRCC), foi usado para a validação da metodologia analítica. O valor de concentração de mercúrio total no certificado com incerteza expandida é de  $4,64 \pm 0,26$   $\mu\text{g g}^{-1}$  [6].

### 2.3. Estudo da Homogeneidade e da estabilidade

Para o estudo de homogeneidade foram separados aleatoriamente 10 sachês à temperatura de  $23 \pm 0,2$  ° C. A ferramenta estatística ANOVA foi utilizada, para avaliar a possível heterogeneidade entre os sachês e dentro dos sachês, como esta descrito no ISO Guide 35 [1, 3].

O estudo de estabilidade foi conduzido com 16 sachês selecionados aleatoriamente por um período de 0, 7, 15, 30 e 45 dias em 4 faixas de temperatura diferentes 5 ° C, 23 ° C, 40 ° C e 60 ° C por meio do modelo isócrono. A avaliação dos resultados do estudo de estabilidade do material foi realizada por meio da análise de regressão linear [2, 3].

### 2.4 Estimativa da incerteza do material

A estimativa da incerteza de caracterização ( $u_{\text{char}}$ ) neste trabalho foi calculada em planilha eletrônica desenvolvida no laboratório, segundo o

Guia para Expressão de incertezas de medição (GUM) [1-3]. Para quantificar a incerteza relativa devido à homogeneidade foi utilizado o resultado da média quadrática obtido por análise de variância (ANOVA-fator único) de acordo com a equação 1 [1]:

$$s_{bb} = s_A = \sqrt{\frac{MQ_{entre} - MQ_{dentro}}{n_0}} \quad (1)$$

Onde:  $s_{bb} = s_A$  = incerteza da homogeneidade;  $MQ_{entre}$  = média quadrática entre os sachês;  $MQ_{dentro}$  = média quadrática dentro dos sachês e  $n_0$  = número de sachês.

A incerteza inerente a estabilidade é calculada pela multiplicação do valor do erro padrão da inclinação da curva de regressão pelo período de tempo do estudo (em meses) de acordo com a equação 2 [2, 3].

$$u_{sts} = s_{(b1)} \cdot t \quad (2)$$

Empregando-se a equação 3 e assumindo-se como variáveis independentes, a incerteza associada à homogeneidade, estabilidade e caracterização, calculou-se a incerteza associada aos valores de propriedade do material de referência, com fator de abrangência ( $k=2$ ) [2]:

$$u_{MR} = k \sqrt{u_{car}^2 + u_{bb}^2 + u_{sts}^2} \quad (3)$$

### 3. RESULTADOS

Os resultados da incerteza de caracterização  $u(car)$  foram  $0,033 \mu\text{g g}^{-1}$  (12%), obtido a partir do um método de medição única (FIA-CV-AAS), em que a propagação do erro foi realizada no modelo de diagrama de Ishikawa, onde cada parâmetro foi calculado por planilha eletrônica, desenvolvida no laboratório para a determinação de mercúrio em peixes (ensaio acreditado na CGCRE/INMETRO segundo ABNT: NBR ISO / IEC 17025: 2005). A tabela 1 apresenta os resultados do estudo de homogeneidade, obtidos pela Anova-fator único.

Tabela 1-Resultados médios  $\pm$  desvio padrão (DP), em  $\mu\text{g g}^{-1}$ , para o estudo de homogeneidade realizado à temperatura  $23 \pm 0,3 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $n=30$

Média $\pm$ DP	0,294 $\pm$ 0,009
RSD %	1,3
P-value	0,19
F <sub>crit.</sub>	3,88
F <sub>calc.</sub>	1,85
ubb, $\mu\text{g g}^{-1}$ , (%)	0,015 (5 %)

F<sub>calc.</sub>: calculado; F<sub>crit.</sub>: crítico, valor de F para  $\alpha = 5 \%$ ; P-valor > 0,05;  $u_{bb}$ : incerteza de homogeneidade; saches n° 56, 14, 21, 42, 3.

Os resultados obtidos para o estudo de homogeneidade comprovaram a homogeneidade do material, pois o  $F_{calc.} < F_{crit.}$ .

As tabelas 2 e 3 apresentam os resultados dos estudos de estabilidade, realizado em um prazo de 45 dias e em diferentes condições.

Tabela 2- Resultados médios  $\pm$  desvio padrão (DP), em  $\mu\text{g g}^{-1}$ , obtidos para o estudo de estabilidade, durante o período de 0, 7, 15, 30 e 45 dias;  $n = 48$

	Geladeira ( $5 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$ )	Ambiente ( $23 \pm 0,3 \text{ }^\circ\text{C}$ )
Média $\pm$ DP	0,313 $\pm$ 0,015	0,325 $\pm$ 0,025
RSD %	1,5	2,5
$b1$	0,0006	-0,0073
$s(b1)$	0,00502	0,01325
$ b1  < t(0,95, n-2) \times s(b1)$	0,02	0,02
$u_{sts}$ , $\mu\text{g g}^{-1}$ , (%)	0,010 (1 %)	0,026 (2,6 %)

$b_1$ : slope da curva;  $s_b$ : desvio padrão em  $b_1$ ;  $u_{sts}$ : incerteza de estabilidade;  $t(0,95, n-2) \times s(b1)$  valor do fator t (Student's) para  $n-2$  graus de liberdade com nível de confiança de 95 % [2].

Tabela 3- Resultados médios  $\pm$  desvio padrão (DP), em  $\mu\text{g g}^{-1}$ , obtidos para o estudo de estabilidade, durante o período de 0, 7, 15, 30 e 45 dias; n = 48

	Estufa (40 $\pm$ 1,3 °C)	Estufa (60 $\pm$ 1,2 °C)
Média $\pm$ DP	0,375 $\pm$ 0,038	0,380 $\pm$ 0,029
RSD %	3,8	2,9
b1	0,0024	-0,0003
s(b1)	0,00018	0,0013
$ b1  < t(0,95, n- 2) \times s(b1)$	0,03	0,03
usts, $\mu\text{g g}^{-1}$ , (%)	0,001 (0,1 %)	0,003(0,3 %)

b<sub>1</sub>: slope da curva; s<sub>b</sub>: desvio padrão em b<sub>1</sub>; u<sub>sts</sub>: incerteza de estabilidade; t<sub>0, 95, n-2</sub> x s(b1) valor do fator t (Student's) para n-2 graus de liberdade com nível de confiança de 95 % [2].

Os dados obtidos na avaliação estatística para a concentração de mercúrio no tecido muscular de peixe durante o intervalo de tempo e temperaturas estudadas não apresentou tendência, mostrando que o resultado de  $|b_1|$  foi menor do que o valor da condição  $t_{0,95, n-2} \times s(b_1)$  [2, 7].

A tabela 4 apresenta o valor de concentração de mercúrio total com a estimativa da incerteza expandida para o material de referência de acordo com a equação 3.

$$u_{MR} = 2 \times \sqrt{(0,033)^2 + (0,015)^2 + (0,026)^2} = 0,089$$

Tabela 4- Estimativa da incerteza padrão combinada, em  $\mu\text{g g}^{-1}$ , para o elemento mercúrio

	<sup>a</sup> Média $\pm$ U ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	U (%)
U <sub>MR(Hg)</sub>	0,294 $\pm$ 0,089	30

<sup>a</sup>Média obtida no estudo de homogeneidade, representada pelos valores médios de 30 replicatas; Hg: Mercúrio total.

#### 4. CONCLUSÃO

O material produzido para ser utilizado em ensaios de proficiência apresentou boa homogeneidade para o elemento Hg dentro de cada sachê e entre os sachês. Os resultados de

estabilidade obtidos em curto prazo são robustos e demonstram a eficácia do processo de irradiação para o transporte das amostras à temperatura ambiente.

Os resultados do cálculo de incerteza mostraram-se compatíveis com a técnica de medição usada para estimar a incerteza do material. Portanto, o material produzido foi considerado apto para ser utilizado em testes de proficiência para a matriz peixe, proporcionando mais uma ferramenta para controle e garantia de qualidade na análise química do elemento mercúrio em peixes.

O ensaio de proficiência foi realizado em 30 dias, por este motivo não foi necessário à realização do estudo de estabilidade em longo prazo, apenas o monitoramento da estabilidade durante o período de realização do ensaio.

#### 4.1 Agradecimentos

Somos gratos ao IPEN-CNEN/SP e CNPq pelo apoio financeiro na preparação deste trabalho.

#### 5. REFERENCIAS

- [1] BIPM, IEC, IFCC, ISO, IUPAC, IUPAP, OIML 2008 Guide to the expression of uncertainty in measurement, 1st edn. International Organization for Standardization (ISO), Geneva
- [2] ISO, International Organization of Standardization 2006 Certification of reference materials—general and statistical principles. ISO Guide 35. 3rd edn, Geneva
- [3] van der Veen A M H , Linsinger T P, Pauwels J 2001 Accred. Qual. Assur. **6** 290
- [4] van der Veen AMH, Linsinger T P J, Lamberty A, Pauwels J 2001 Accred. Qual. Assur. **6** 257
- [5] Aquino JS, Silva JA, Prado JP, Cavalheiro JMO 2008 Rev. Inst. Adolfo Lutz, **67(3)**:190-195
- [6] Azevedo S J, Sarkis J E S, Hortellani M A, Ladle R J 2012 Water Air Soil Pollut. DOI 10.1007/s11270-012-1160-2
- [7] van der Veen A M H, Pauwels J 2000 Accred. Qual. Assur. **5** 327