

Análise de produtos agroalimentares, utilizando técnicas espectrofotométricas

Ana Filipa da Rocha Oliveira

Mestrado em Química

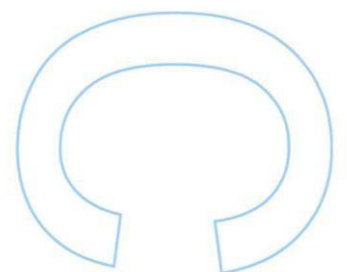
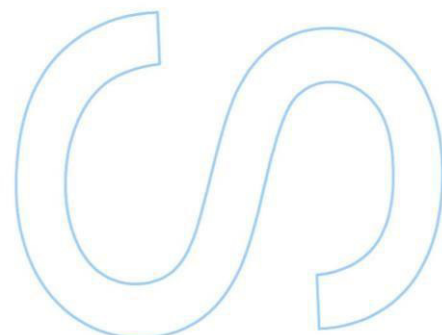
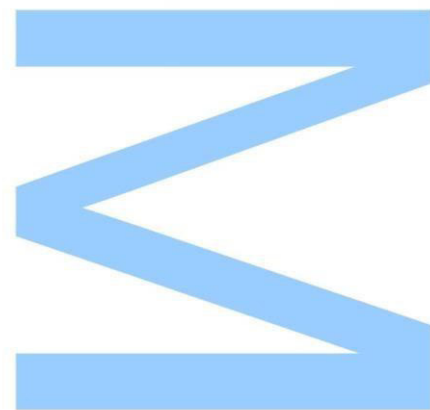
Departamento de Química e Bioquímica da FCUP
2015

Orientador

Paulo Almeida, Professor Auxiliar, FCUP

Coorientador

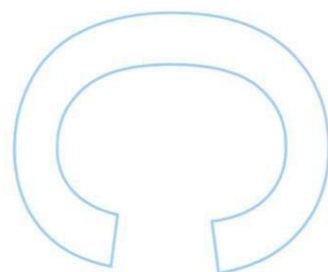
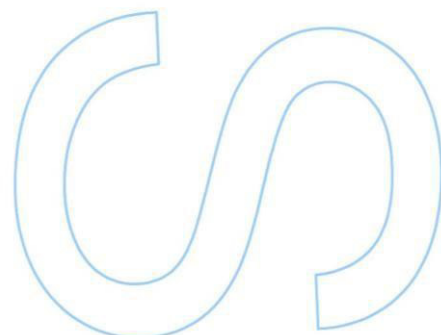
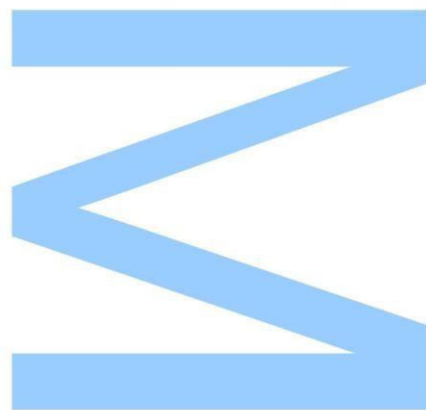
Alice Santos, Responsável Laboratório de Físico-Química, *Silliker* Portugal



Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____ / ____ / ____



Agradecimentos

Aos meus pais e ao Miguel, pelo apoio incondicional que demonstraram desde o início e sem os quais nada disto seria possível. Pelas palavras de encorajamento, pelo voto de confiança depositado, pela fé que tinham em saber que era capaz, mesmo quando eu duvidei. Por uma vida de contínuos ensinamentos que me levaram à mulher que sou hoje, amo-vos.

Ao Pedro, pela paciência e pelo carinho. Pela boa vontade que demonstrou para ler páginas imensas, pela incessante ajuda no que quer que pedisse (e não foi pouco). Pelas minhas distrações quando não as devia ter e por estar ao meu lado incondicionalmente. Obrigada.

Agradeço ao Professor Doutor Paulo Almeida pelo incentivo, pela utilidade das recomendações, cordialidade com que sempre me recebeu e pela disponibilidade demonstrada em todas as fases que levaram à concretização deste trabalho.

À Andreia e ao Ricardo, que foram mais do que colegas e que são hoje meus amigos, obrigada por me aturarem e por juntos termos concluído mais uma jornada. Não era o mesmo sem vocês.

A toda a equipa da *Silliker*, por me receberem de braços abertos.

Às pessoas maravilhosas do Laboratório de Métodos Instrumentais de Análise, nomeadamente ao Pedro Pereira, à Joana Rangel, à Laura Sousa e à Olga Delgado pelos bons conselhos e sugestões, pela atenção e paciência que sempre demonstraram, mas principalmente pelo bom ambiente de trabalho e pela boa disposição que é bem particular desse laboratório. Um obrigado muito especial à Isabel Araújo pelos ensinamentos, pela (muita) paciência, pela boa vontade, pelas palavras de incentivo e pelo companheirismo, mesmo depois do estágio ter terminado. Nunca vos esquecerei.

Um agradecimento particular à Doutora Alice Santos pela disponibilidade sempre demonstrada e pelos preciosos ensinamentos que levo comigo e que contribuiram largamente para um melhor desenvolvimento profissional.

A mais profunda gratidão a todos!

Resumo

Os alimentos são a principal fonte de metais essenciais para o ser humano. Esses metais são necessários em várias funções vitais do nosso organismo, podendo a sua deficiência causar sérios problemas para a saúde. No entanto, outros metais quando presentes no organismo podem causar intoxicações, mesmo em concentrações extremamente baixas. Como tal, é necessária a determinação dos teores dos metais essenciais, bem como dos metais prejudiciais nos produtos alimentares.

A nível europeu existem dois regulamentos que são considerados importantes no que respeita aos alimentos. O regulamento (EU) Nº 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho, relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios, vem estabelecer as regras e os requisitos para a apresentação da declaração nutricional relativa aos géneros alimentícios, com a inclusão da informação nutricional nas embalagens. A declaração nutricional obrigatória inclui a informação sobre o teor de sal. E o regulamento (CE) Nº 1881/2006 da Comissão fixa os teores máximos de certos contaminantes, designadamente do cádmio e do chumbo, presentes nos géneros alimentícios.

No âmbito do trabalho de estágio, foram analisados produtos agroalimentares com o intuito de determinar vários elementos, por espectrofotometria de absorção atómica com chama (FAAS) na determinação de cálcio, zinco, potássio e sódio e com câmara de grafite (GFAAS) na determinação de cádmio e chumbo. Para além disto, adaptou-se a metodologia para a determinação do sódio em vinhos. Foram utilizados como métodos de pré-tratamento das amostras a digestão por via seca e a digestão por micro-ondas.

Os métodos utilizados foram validados para as matrizes alimentares, tais como: bolachas, leite, produtos cárnicos, cevada, alimentos infantis, e produtos da pesca. Foram também analisadas amostras de circuitos interlaboratoriais como: *Soya Flour*, *Chilli Powder* e o *Offal (Liver)* e utilizadas ferramentas do controlo de qualidade. A determinação do teor dos metais nos alimentos selecionados revelou teores de sódio muito variados, sendo estes mais elevados em alimentos processados como um produto cárnico, e teores dos metais tóxicos abaixo dos teores máximos legislados. Foi também realizada a validação do método utilizado na determinação do sódio em vinhos. Os ensaios realizados mostraram que esse método é adequado atendendo à exatidão e à precisão.

Abstract

Food is the main source of essential metals to humans. These metals are needed in several vital functions of our body, its deficiency can cause serious problems for health. However, other metals, when present in the body can cause poisoning even in extremely low concentrations. So, the determination of concentrations of the essential metals as well as the harmful ones is required in food products.

In Europe there are two regulations that are considered important for food products. The Regulation (EU) No 1169/2011 of the European Parliament and of the Council on the provision of information to consumers on foods, is to establish the rules and requirements for the presentation of the nutrition declaration on foodstuffs, with the inclusion of nutritional information on packaging. The mandatory nutrition declaration includes information about the salt content. And the Regulation (EC) No 1881/2006 of the Commission setting maximum levels for certain contaminants, including cadmium and lead, in foodstuffs.

In this internship, food products were analyzed in order to determine various elements, by flame atomic absorption spectrophotometry (FAAS) for the determination of calcium, zinc, potassium and sodium and graphite furnace (GFAAS) for the determination of cadmium and lead. In addition, the methodology was adapted for the determination of sodium in wines. Were used as sample pretreatment methods, the dry-ashing and the microwave assisted digestion.

The methods used are validated for food matrices, such as: wafers, milk, meat products, barley, baby foods and fishery products. Were also analysed inter circuit samples such as: *Soya Flour, Chilli Powder* and *Offal (Liver)* and used quality control tools. The determination of the content of these metals in various foods showed very different sodium levels, which are higher in processed foods like meat product, and levels of toxic metals below legislated maximum levels. It was also performed the validation of the method used in determining the sodium in wines. The essays showed that the method is suitable, attending to accuracy and precisin.

Índice

Agradecimentos	2
Resumo.....	3
Abstract.....	4
Índice de figuras	8
Índice de tabelas	9
Parte I	15
1. Introdução	16
1.1. <i>Silliker</i> Portugal, S.A.....	17
1.2. Enquadramento do trabalho de estágio	20
1.2.1. Regulamento (EU) N° 1169/2011.....	20
1.2.2. Regulamento (CE) N° 1881/2006 da Comissão, de 19 de Dezembro de 2006	21
1.2.3. Regulamento (CE) N° 1924/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 20 de Dezembro de 2006	22
1.3. Objetivos do Estágio	23
2. Fundamentos teóricos.....	24
2.1. Metais nos alimentos	24
2.1.1. Minerais.....	24
2.1.1.1. Cálcio	25
2.1.1.2. Zinco.....	26
2.1.1.3. Sódio e Potássio.....	27
2.1.2. Metais Tóxicos	28
2.1.2.1. Cádmio	29
2.1.2.2. Chumbo.....	32
3. Técnicas analíticas para a determinação de metais em alimentos	35
3.1. Espectrofotometria Atómica	36
3.1.1. Espectrofotometria de Absorção Atómica com Chama (FAAS).....	41
3.1.2. Espectrofotometria de Absorção Atómica com Câmara de Grafite (GFAAS) ...	44
3.2. Pré – tratamento das amostras	46

3.2.1.	Digestão por via seca	46
3.2.2.	Digestão por via húmida	47
Parte II	49
4.	Execução experimental	50
4.1.	Material e equipamento utilizados	50
4.2.	Reagentes e soluções utilizados	51
4.3.	Amostras	52
4.4.	Método de determinação de cálcio, zinco, potássio e sódio numa bolacha, num leite e num produto cárnico	53
4.4.1.	Digestão da matéria orgânica por via seca	53
4.4.2.	Digestão da matéria orgânica por micro-ondas	54
4.4.3.	Soluções padrão de cálcio, zinco, potássio e sódio	54
4.4.4.	Análise das amostras e condições operatórias	55
4.5.	Método de determinação do cádmio e chumbo em cevada, atum, alimento infantil, sardinha e pescada	56
4.5.1.	Digestão da matéria orgânica por via seca	56
4.5.2.	Digestão da matéria orgânica por micro-ondas	56
4.5.3.	Soluções padrão de cádmio e chumbo	57
4.5.4.	Análise das amostras e condições operatórias	57
4.6.	Determinação do sódio em vinhos e validação do método	59
4.6.1.	Soluções padrão de sódio	59
4.6.2.	Análise das amostras e condições operatórias	59
5.	Resultados e discussão	60
5.1.	Determinação do cálcio, zinco, potássio e sódio numa bolacha, num leite e num produto cárnico, após digestão da matéria orgânica por via seca	60
5.1.1.	Curvas de calibração	60
5.1.2.	Resultados obtidos nas análises das amostras	65
5.1.3.	Cálcio	67
5.1.4.	Zinco	68
5.1.5.	Potássio	68

5.1.6.	Sódio	69
5.1.7.	Determinação do sódio numa bolacha, num leite e num produto cárnico após digestão por micro-ondas	70
5.1.8.	Comparação dos resultados obtidos na determinação do sódio por FAAS, pelos dois métodos de digestão da matéria orgânica (via seca e micro-ondas)	72
5.2.	Determinação de cádmio e de chumbo em cevada, atum, alimento infantil, sardinha e pescada	74
5.2.1.	Curvas de calibração	74
5.2.2.	Avaliação do desempenho do método e do analista	76
5.2.3.	Resultados obtidos nas análises das amostras	79
5.3.	Determinação do sódio em vinhos e validação do método	82
5.3.1.	Precisão	82
5.3.2.	Exatidão	92
5.3.3.	Limites de quantificação	93
5.3.4.	Linearidade.....	96
5.3.5.	Gama de trabalho	96
5.3.6.	Incerteza.....	96
5.3.7.	Apresentação dos resultados analíticos.....	97
6.	Conclusões	99
7.	Bibliografia	101
8.	Anexos	112

Índice de figuras

Figura 1 - Instalações da Silliker Portugal SA. ^[7]	17
Figura 2 - Esquema de um espectrofotómetro de absorção atómica de feixe simples ^[76]	39
Figura 3 - Esquema de um espectrofotómetro de absorção atómica de feixe duplo ^[76]	39
Figura 4 - Diagrama de uma lâmpada de cátodo oco ^[77]	40
Figura 5 - Diagrama de uma lâmpada de descarga sem eléctrodos ^[73]	40
Figura 6 - Estrutura de um queimador de fluxo laminar utilizado em espectrofotometria de absorção atómica com chama ^[73]	42
Figura 7 - Regiões da chama num queimador ^[73]	42
Figura 8 - Programa de temperaturas típico da atomização eletrotérmica.	44
Figura 9 – Esquema de um corte transversal de um atomizador de câmara de grafite ^[73]	45
Figura 10 - Espectrofotómetro de absorção atómica com atomização por chama e amostrador automático, Agilent.	51
Figura 11 - Espectrofotómetro de absorção atómica com câmara de grafite e amostrador automático, Agilent.	51
Figura 12 - Principais etapas de preparação da amostra: A - Triturador Grindomix; B - Colocação das batatas no copo de trituração; C - Amostra após trituração; D - Amostra homogeneizada; E - Acondicionamento da amostra em frascos de plástico	52
Figura 13 - Etapas da digestão da matéria orgânica por via seca: A – pesagem; B – Calcinação em placa eléctrica; C – Incineração em mufla; e D – preparação das soluções das amostras. ...	53
Figura 14 - Digestor de micro-ondas da CEM com amostrador automático utilizado.	54
Figura 15 - Cadinhos com as cinzas das amostras obtidas após incineração na mufla.	56
Figura 16 - Comparação entre as curvas de calibração obtidas para o cálcio (A - gama completa e B - gama baixa), zinco (C), potássio (D) e sódio (E) com as curvas de calibração efetuadas em análises de rotina no laboratório (Lab 1 e Lab 2).	62
Figura 17 - Curva de calibração obtida para o Na, pelo método de FAAS no em 2014-10-31.	93
Figura 18 - Carta de controlo do limite de quantificação do método da determinação do sódio por FAAS.....	95

Índice de tabelas

Tabela 1 - Alguns parâmetros determinados nos laboratórios da Siliker ^[12]	18
Tabela 2 - Declaração nutricional mínima obrigatória pelo Regulamento (EU) N ^o 1169/2011 ^[10]	21
Tabela 3 - Teores de cádmio detetados em alguns alimentos ^[36]	29
Tabela 4 - Teores máximos de Cádmio admissíveis em géneros alimentícios apresentados no Regulamento N ^o 488/2014 da Comissão de 12 de Maio de 2014 ^[43]	31
Tabela 5 - Teores de chumbo detetados em alguns alimentos ^[36]	32
Tabela 6 - Teores máximos de Chumbo admissíveis em géneros alimentícios apresentados no Regulamento N ^o 1881/2006 da Comissão de 19 de Dezembro de 2006 ^[11]	33
Tabela 7 - Métodos de atomização mais utilizados em espectrofotometria atómica ^[73]	36
Tabela 8 - Comparação das técnicas de espectrofotometria atómica ^[2]	38
Tabela 9 - Lista de chamas utilizadas em espectroscopia atómica ^[73]	43
Tabela 10 - Amostras utilizadas em FAAS e GFAAS, descrição e proveniência.	52
Tabela 11 - Condições de digestão das amostras: A - método utilizado para amostras húmidas; B - método utilizado para amostras secas ou com alto teor de gordura.	54
Tabela 12 - Condições de análise utilizadas na determinação de cálcio, zinco, potássio e sódio por FAAS.	55
Tabela 13 - Condições utilizadas para a digestão das amostras secas ou com alto teor de gordura.	56
Tabela 14 – Condições de análise utilizadas na determinação de cádmio e chumbo por GFAAS.	57
Tabela 15 - Programação dos tempos e temperaturas da câmara de grafite para a determinação do cádmio.	58
Tabela 16 - Programação dos tempos e temperaturas da câmara de grafite para a determinação do chumbo.	58
Tabela 17 – Parâmetros das retas de calibração efetuadas para a determinação de cada um dos elementos pelo método de FAAS com digestão da matéria orgânica por via seca.	60
Tabela 18 - Limiares analíticos calculados a partir das curvas de calibração e LQ definidos pelo laboratório para a determinação do cálcio, zinco, potássio e sódio pelo método de FAAS com digestão da matéria orgânica por via seca.	63
Tabela 19 - Erro relativo para a análise dos padrões de controlo do cálcio, zinco, potássio e sódio pelo método de FAAS com digestão da matéria orgânica por via seca.	64
Tabela 20 - Avaliação do desempenho do método - Valores obtidos para o padrão diário de controlo (DPC) do cálcio, zinco, potássio e sódio pelo método de FAAS com digestão da matéria orgânica por via seca.	66

Tabela 21 - Desvio relativo do duplicado efetuado para a determinação do cálcio, zinco, potássio e sódio pelo método de FAAS com digestão da matéria orgânica por via seca.	67
Tabela 22 - Teores de cálcio determinados pelo método de FAAS com digestão da matéria orgânica por via seca nos alimentos selecionados e respectiva % do valor diário de referência (VDR).	67
Tabela 23 - Teores de zinco determinados pelo método de FAAS com digestão da matéria orgânica por via seca nos alimentos selecionados e respectiva % do valor diário de referência (VDR).	68
Tabela 24 - Teores de potássio determinados pelo método de FAAS com digestão da matéria orgânica por via seca nos alimentos selecionados e respectiva % do valor diário de referência (VDR).	69
Tabela 25 - Teores de sódio determinados pelo método de FAAS com digestão da matéria orgânica por via seca nos alimentos selecionados e respectiva % do valor diário de referência (VDR).	69
Tabela 26 - Parâmetros da reta de calibração do sódio, efetuadas por FAAS com digestão da matéria orgânica por micro-ondas.	70
Tabela 27 - Limiares analíticos determinados e limites de quantificação definidos pelo laboratório para a determinação de sódio pelos métodos FAAS com digestão da matéria orgânica por micro-ondas.	70
Tabela 28 - Erro relativo para a análise dos padrões de controlo do sódio pelo método FAAS com digestão da matéria orgânica por micro-ondas (erro máximo aceitável - 15 %).	71
Tabela 29 - Resultados obtidos para a determinação de sódio na bolacha em duplicado pelo método FAAS com digestão da matéria orgânica por micro-ondas.	71
Tabela 30 - Teores de sódio determinados pelo método de FAAS com digestão da matéria orgânica por micro-ondas nos alimentos selecionados e respectiva % do valor diário de referência (VDR).	71
Tabela 31 - Parâmetros das retas de calibração efetuadas para a análise do sódio por FAAS, pelos dois métodos de digestão da matéria orgânica, via seca e micro-ondas.	72
Tabela 32 - Limiares analíticos determinados e limites de quantificação definidos pelo laboratório para a determinação do sódio por FAAS, pelos dois métodos de digestão da matéria orgânica, via seca e micro-ondas.	72
Tabela 33 - Resultados das amostras na determinação do sódio por FAAS pelos dois métodos de digestão da matéria orgânica, via seca e micro-ondas.	73
Tabela 34 - Parâmetros das retas de calibração efetuadas para a análise do cádmio e do chumbo por GFAAS, com digestão da matéria orgânica por via seca.	74
Tabela 35 - Parâmetros das retas de calibração efetuadas para a análise do cádmio e do chumbo por GFAAS, com digestão da matéria orgânica por micro-ondas.	74

Tabela 36 - Limiares analíticos calculados para o cádmio e chumbo a partir das curvas de calibração e LQ definido pelo laboratório para o método GFAAS, pelos métodos de digestão por via seca e micro-ondas.....	75
Tabela 37 - Erro relativo para a análise dos padrões de controlo do cádmio e chumbo pelo método GFAAS, pelos métodos de digestão por via seca e micro-ondas (erro máximo aceitável: 20%).....	76
Tabela 38 - Resultados obtidos para a análise de cádmio e chumbo na amostra Soya Flour T07204 pelo método GFAAS.....	77
Tabela 39 - Z-scores da amostra Soya Flour T07204 obtidos para a análise de chumbo do cádmio, pelo método GFAAS.	77
Tabela 40 - Resultados obtidos para a análise de cádmio em amostras FAPAS pelo método GFAAS, com digestão da matéria orgânica por micro-ondas.	78
Tabela 41 - Z-scores das amostras Soya Flour e Offal (Liver) (FAPAS) obtidos para a análise do cádmio, pelo método GFAAS.	79
Tabela 42 - Resultados obtidos para a análise da amostra diária de controlo (DPC) do cádmio e do chumbo pelo método GFAAS para avaliação do desempenho do método.	79
Tabela 43 - Teor de cádmio determinado pelo método GFAAS em várias amostras de alimentos e teor máximo legislado ^[43]	80
Tabela 44 - Teor de chumbo determinado pelo método GFAAS em várias amostras de alimentos e teor máximo legislado ^[11]	80
Tabela 45 - Precisão esperada, a nível do coeficiente de variação (CV), em função da concentração de analito ^[105]	83
Tabela 46 – Estudo da repetibilidade para o sódio na matriz vinho.....	84
Tabela 47 - Teste de Cochran para as cinco matrizes de vinhos estudadas.	85
Tabela 48 - Matrizes eliminadas (após execução do teste de Cochran).....	85
Tabela 49 - Teste de Grubbs na determinação do sódio por FAAS para a matriz vinhos.	86
Tabela 50 - Resultados obtidos nos ensaios realizados para avaliar a precisão, em termos de precisão intermédia, do método de determinação de Na, para a matriz Bipea 2014 - Wine Flavoured Drink.	88
Tabela 51 - Resultados obtidos nos ensaios realizados para avaliar a precisão, em termos de precisão intermédia, do método de determinação de Na, para a matriz Bipea 2014 - Red Wine.	89
Tabela 52 - Resultados obtidos nos ensaios realizados para avaliar a precisão, em termos de precisão intermédia, do método de determinação de Na, para a matriz Bipea 2014 - White Wine.	90

Tabela 53 - Resultados obtidos nos ensaios realizados para avaliar a precisão, em termos de precisão intermédia, do método de determinação de Na, para a matriz Bipea 2015 - Mistelle Wine.....	91
Tabela 54 - Resultados obtidos nos ensaios realizados para avaliar a precisão, em termos de precisão intermédia, do método de determinação de Na, para a matriz Bipea 2014 - Semi-sparkling Wine.....	92
Tabela 55 - Parâmetros da exatidão para as matrizes dos vinhos estudados.	93
Tabela 56 - Parâmetros da reta de calibração efetuada para a determinação do Na por FAAS, no dia 2014-10-31.	93
Tabela 57 - Limiares analíticos calculados a partir das curvas de calibração e LQ definidos pelo laboratório para a determinação do Na, no dia 2014-10-31.....	94
Tabela 58 - Validação dos limiares analíticos do método da determinação do sódio por FAAS.	94
Tabela 59 - Valores utilizados na construção da carta de controlo do limite de quantificação do método da determinação do sódio por FAAS.	94
Tabela 60 - Erro relativo para a análise dos padrões de controlo do Osódio pelo método FAAS, no dia 2014-10-31. (erro máximo aceitável – 15 %).....	95
Tabela 61 - Dados relativos aos certificados de análise das matrizes utilizadas na validação do método da determinação do sódio por FAAS.	97
Tabela 62 - Dados relativos ao cálculo da incerteza do método da determinação do sódio por FAAS.....	97
Tabela 63 - Apresentação dos resultados analíticos da precisão Intermédia do método da determinação do sódio por FAAS.....	98

Lista de abreviaturas

- AAS** – Espectrofotometria de absorção atômica (atomic absorption spectrometry)
- AES** – Espectrofotometria de emissão atômica (atomic emission spectrometry)
- AFS** – Espectrofotometria de fluorescência atômica (atomic fluorescence spectrometry)
- ASAE** - Autoridade de Segurança Alimentar e Económica
- ATSDR** – Agência para as substâncias tóxicas e o registo de doenças (Agency for Toxic Substances and Disease Registry)
- BIPEA** – Bureau Interprofessionnel des Etudes Analytiques
- CVAAS** – Espectrofotometria de absorção atômica com vapor frio (cold vapor atomic absorption spectrometry)
- DPCS** – Amostra diária de controlo (Daily Process Control Sample)
- EPA** - Agência de proteção ambiental (Environmental Protection Agency)
- FAAS** – Espectrofotometria de absorção atômica com chama (flame atomic absorption spectrometry)
- FAES** – Espectrofotometria de emissão atômica (flame atomic emission spectrometry)
- FAO** – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (Food and Agriculture Organization of the United Nations)
- FAPAS** – Food analysis Performance Assessment Scheme
- GFAAS** – Espectrofotometria de absorção atômica eletrotérmica ou com câmara de grafite (graphite furnace atomic absorption spectrometry)
- HGAAS** – Espectrofotometria de absorção atômica com geração de hidretos (hydride generation atomic absorption spectrometry)
- IARC** - Agência Internacional de pesquisa em cancro (International Agency for Research on Cancer)
- ICP-AES** – Espectrofotometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry)
- ICP-MS** – Espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry)
- IPAC** – Instituto Português de Acreditação
- LD** – Limite de deteção
- LQ** – Limite de quantificação
- MIA** – Métodos Instrumentais de Análise
- OMS** – Organização Mundial de Saúde
- r** – limite de repetibilidade
- UE** – União europeia

UV – Ultravioleta

VDR – Valor diário de referência

Parte I

1. Introdução

Atualmente, existe uma grande preocupação por parte das indústrias alimentares em atender às exigências de um mercado cada vez mais competitivo, procurando o máximo de qualidade ao mais baixo custo para aquilo que é produzido. Assim, o setor de Controlo da Qualidade numa empresa torna-se dos mais importantes, sendo que este é o setor responsável pela averiguação da qualidade do produto.

A análise de alimentos é muito importante para a avaliação do seu valor nutricional, para o controlo da qualidade de produtos frescos e processados e para a monitorização de aditivos e contaminantes alimentares tóxicos ^[1]. Os alimentos são a principal fonte de nutrientes e minerais essenciais do organismo humano, como tal, é fundamental que se faça uma análise química exata e precisa dos seus teores, para que os consumidores e profissionais de saúde possam fazer escolhas e recomendações responsáveis com base no seu teor nutricional ^[2]. Por outro lado, sabe-se que grande parte dos minerais considerados essenciais são metais e destes, quase todos são tóxicos quando absorvidos pelo organismo humano em concentrações elevadas, como o cobre e o zinco, por exemplo. No entanto, existem metais que causam intoxicações mesmo em concentrações extremamente baixas, como o chumbo e o arsénio ^[3,4]. Deste modo, e para que não causem danos toxicológicos ao Homem, estes metais contaminantes devem ser mantidos em níveis controlados.

Do ponto de vista analítico, os métodos mais adequados para a determinação destes metais são os métodos espectrofotométricos, sendo os métodos de espectrofotometria atómica os mais usuais para a determinação de metais em géneros alimentares ^[2,5].

Neste trabalho recorreu-se ao uso de técnicas espectrofotométricas na determinação de metais em produtos agroalimentares, nomeadamente espectrofotometria de absorção atómica com chama e com câmara de grafite, utilizando como técnicas de pré-tratamentos de amostras a digestão da matéria orgânica por via seca e por micro-ondas.

Os elementos determinados foram quatro minerais essenciais: o cálcio, o zinco, o potássio e o sódio por espectroscopia de absorção atómica por chama, e dois metais tóxicos, o chumbo e o cádmio por espectroscopia de absorção atómica com câmara de grafite. Em todas as determinações realizadas foram aplicadas ferramentas de controlo da qualidade para a validação dos resultados obtidos.

Os métodos que se utilizaram já estavam implementados do laboratório de Métodos Instrumentais de Análise da empresa *Silliker Portugal, S.A.*

1.1. **Silliker Portugal, S.A.**

A segurança alimentar é nos dias de hoje uma preocupação crescente que apresenta desafios para as políticas atuais de saúde pública em muitos países.

A *Silliker*, adquirida em 1996 pelo Instituto *Mérieux*, conta com mais de 45 anos de experiência nas áreas da segurança alimentar e de nutrição ^[6].

A *Silliker Portugal, S.A.* é uma empresa independente de prestação de serviços para o setor agroalimentar. A empresa está situada na zona industrial de Canelas, Vila Nova de Gaia (Figura 1).



Figura 1 - Instalações da Silliker Portugal SA. ^[7].

Fundada em 1993 como *EGI- Sociedade de Engenharia e Gestão de Qualidade Industrial, Lda.*, integra desde 2008 o grupo *Silliker*, líder mundial na prestação de serviços que visam a melhoria da qualidade e segurança alimentar ^[8].

A equipa *Silliker Portugal* é constituída por especialistas das mais diversas áreas do setor alimentar. A garantia da qualidade dos serviços prestados é baseada na competência da equipa, na adequação dos métodos, na atualização permanente de procedimentos e equipamentos, e no sistema de melhoria contínua. A sua estrutura permite oferecer uma ampla gama de serviços, onde se inclui o serviço de análises microbiológicas, químicas e sensoriais; consultadoria em segurança alimentar e desenvolvimento; auditorias; rotulagem e legislação ^[9].

A *Silliker Portugal, S.A.* está integrada no Sistema Português da Qualidade desde 1993, devido à acreditação do seu laboratório (Certificado de acreditação nºL0087), tendo implementado um rigoroso sistema de qualidade que visa o controlo analítico, cumprimento de critérios de acreditação para laboratórios de ensaio estabelecidos pela NP EN ISO/IEC 17025 e

tem assim como parte integrante do seu serviço, um forte compromisso com a qualidade e com a identificação das necessidades dos seus cliente [8].

As suas instalações estão distribuídas por um único piso repartido em duas grandes áreas: Laboratorial e Administrativo. A área laboratorial está dividida em dois laboratórios independentes: Microbiologia e Físico-Química.

O laboratório de microbiologia emprega uma ampla gama de metodologias de teste para verificar a qualidade e segurança microbiológica dos produtos contando com a melhor tecnologia e com profissionais experientes para satisfazer as exigências e os padrões internacionais a que foi proposto [9].

O laboratório de Físico-química é constituído por duas unidades independentes, o laboratório de Físico-química, onde são executadas todas as técnicas clássicas de análise, e o laboratório de Métodos Instrumentais de Análise (MIA), onde são realizadas técnicas cromatográficas e espectrofotométricas [9].

A 13 de Dezembro de 2014 entrou em vigor o Regulamento (UE) nº1169/2011 (descrito mais à frente) que visa a obrigatoriedade da informação nutricional nos rótulos dos produtos alimentares, uma vez que a alimentação e a saúde estão intimamente correlacionadas e cada vez mais os consumidores têm a preocupação de fazer escolhas alimentares adequadas. Assim, o conhecimento do valor calórico, das propriedades nutricionais dos alimentos e os seus componentes funcionais adquire cada vez maior importância [10].

A fim de proteger a saúde pública, os contaminantes têm obrigatoriamente de estar a níveis aceitáveis ao consumo humano do ponto de vista toxicológico. O regulamento (CE) n.º1881/2006 de 19 de Dezembro de 2006 define os teores máximos de alguns contaminantes, tendo em conta o risco relacionado com o consumo dos alimentos [11].

Na Tabela 1 são enumerados os parâmetros que podem ser determinados na *Silliker* recorrendo às mais variadas técnicas analíticas [12].

Tabela 1 - Alguns parâmetros determinados nos laboratórios da *Silliker* [12].

Rotulagem Nutricional	Nutrientes Funcionais	Contaminantes
✓ Valor energético	✓ Ómega 3	✓ Nitratos
✓ Proteínas	✓ Ómega 6	✓ Afatoxinas
✓ Hidratos de carbono	✓ EPA	✓ Ocratoxina A
✓ Lípidos	✓ DHA	✓ Patulina
✓ Fibras alimentares	✓ Cálcio	✓ Desoxinivalenol
✓ Minerais	✓ Isoflavonas	✓ Zearalenona
✓ Vitaminas	✓ Fosfolípidos	✓ Fumonisinias
✓ Corantes	✓ Ácido linoleico	✓ Foxinas T-2 e HT-2
✓ Conservantes	conjugado (CLA)	✓ Metais pesados

✓ Ácidos orgânicos	✓ 3-MCPD
✓ Ácidos gordos componentes	✓ Dioxinas, furanos e PCB
	✓ Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

Pelo facto de ser uma referência a nível mundial no setor alimentar, o grupo *Silliker* necessita de garantir a fiabilidade dos resultados analíticos publicados. Assim, a empresa submete-se a auditorias periódicas internas e externas, e participa a nível nacional e internacional, em circuitos de ensaios de comparação interlaboratorial (ECI), com o propósito de avaliar o seu desempenho. Para além disto, diariamente segue rigorosos procedimentos de controlo de qualidade como o uso de DPCS (*Daily Process Control Sample*), análises de amostras em duplicado e análises de padrões de controlo (em métodos de curva de calibração)

[13].

1.2. Enquadramento do trabalho de estágio

As análises efetuadas na *Silliker* têm como principal objetivo caracterizar e verificar a conformidade dos produtos agroalimentares enviados pelas empresas de prestação de serviços alimentares e os particulares. Assim, a legislação aplicável é tida em conta, de forma a uniformizar a rotulagem alimentar e nutricional e a proteger a saúde do consumidor.

1.2.1. Regulamento (EU) Nº 1169/2011

O Regulamento (EU) Nº 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 25 de Outubro de 2011, relativo à prestação de informação aos consumidores sobre géneros alimentícios. Este regulamento funde as diretivas 2000/13/CE relativa à rotulagem dos géneros alimentícios e 90/496/CEE relativa à rotulagem nutricional, a fim de melhorar os níveis de informação e de proteção dos consumidores europeus ^[10].

O regulamento estabelece os princípios, os requisitos e as responsabilidades gerais que regem a informação sobre géneros alimentícios, em particular a sua rotulagem ^[14]. Tendo em conta a necessidade de proporcionar flexibilidade suficiente para dar resposta a evoluções futuras e a novas exigências de informação, o regulamento garante o direito dos consumidores à informação e procedimentos para a prestação de informação sobre géneros alimentícios.

Os objetivos do novo regulamento são:

- ✓ Garantir um elevado nível de defesa do consumidor, no que refere à informação sobre os géneros alimentícios (rotulagem, particularmente);
- ✓ Assegurar simultaneamente o bom funcionamento do mercado interno;
- ✓ Estabelecer os princípios, os requisitos e as responsabilidades gerais que regem a informação sobre os géneros alimentícios e, em particular, a rotulagem dos géneros alimentícios;
- ✓ Garantir o direito dos consumidores à informação e procedimentos para a prestação de informações sobre os géneros alimentícios.

Aplicabilidade:

- ✓ Aos operadores das empresas do setor alimentar em todas as fases da cadeia alimentar, sempre que as suas atividades impliquem a prestação de informações sobre os géneros alimentícios ao consumidor;

- ✓ A todos os géneros alimentícios destinados ao consumidor final, incluindo os que são fornecidos por estabelecimentos de restauração coletiva e os que se destinam a ser fornecidos a esses estabelecimentos;

Entrada em vigor e data de aplicação:

- ✓ A partir de 13 de Dezembro de 2014.
- ✓ Exceções:
 - ✓ Declaração nutricional (aplicável a 13 de Dezembro 2016);
 - ✓ Requisitos específicos relativos à designação de “carne picada” (aplicável a 1 Janeiro 2014).

Na declaração nutricional mínima obrigatória constam valores nutricionais médios por 100 g ou por 100 mL referentes ao valor energético (kj, kcal), lípidos, dos quais ácidos gordos saturados (g), hidratos de carbono, dos quais açucars (g), proteínas (g) e sal (g) [10].

Além da informação nutricional obrigatória, a declaração pode conter informação nutricional facultativa [15], no entanto, a sua apresentação deve ser feita com base no ilustrado da Tabela 2, respeitando a disposição e ordem dos elementos descritos.

Tabela 2 - Declaração nutricional mínima obrigatória pelo Regulamento (EU) N°1169/2011 [10].

Informação nutricional obrigatória		Informação nutricional facultativa (ou obrigatória em caso de presença de alegações nutricionais ou de saúde)
Energia	--- KJ/Kcal	Ácidos gordos monoinsaturados
Lípidos	--- g	Ácidos gordos polissaturados
Ácidos gordos	--- g	Polióis
Hidratos de carbono	--- g	Amido
Açucars	--- g	Fibra
Proteínas	--- g	Vitaminas e minerais
Sal	--- g	Outros nutrientes (Ómega 3, Ómega 6, ...)

1.2.2. Regulamento (CE) N° 1881/2006 da Comissão, de 19 de Dezembro de 2006

O regulamento (CE) n° 1881/2006 da Comissão, de 19 de Dezembro de 2006, fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios com a finalidade

de proteger a saúde pública e manter os contaminantes a níveis que sejam aceitáveis do ponto de vista toxicológico ^[11].

No caso dos contaminantes que sejam considerados como substâncias cancerígenas genotóxicas ou em casos em que a exposição atual da população ou dos grupos vulneráveis da população se aproxime ou exceda a dose admissível, o regulamento diz que devem definir-se teores máximos a um nível que seja tão baixo quanto razoavelmente possível (ALARA).

Na secção 3 do anexo deste regulamento estão descritos os teores máximos (em mg/kg) de metais existentes em géneros alimentícios.

1.2.3. Regulamento (CE) N° 1924/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 20 de Dezembro de 2006

Pela existência de um número cada vez maior de alimentos rotulados e publicitados e de forma a ser possível assegurar um elevado nível de proteção dos consumidores e a facilitar as suas escolhas, os produtos colocados no mercado, incluindo os importados, deverão ser seguros e devidamente rotulados. Um regime alimentar variado e equilibrado é uma condição indispensável para a manutenção da saúde e os produtos considerados individualmente têm uma importância relativa no contexto do regime alimentar geral.

Desta forma, o Regulamento (CE) N° 1924/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 20 de Dezembro de 2006, relativo às alegações nutricionais e de saúde sobre os alimentos, prevê uma uniformização das rotulagens para os géneros alimentícios ^[16].

1.3. Objetivos do Estágio

Este trabalho tem como objetivo principal a determinação de cálcio, zinco, potássio e sódio por espectrofotometria de absorção atômica com chama e a determinação dos metais tóxicos cádmio e chumbo por espectrofotometria de absorção atômica com câmara de grafite existentes em produtos alimentares.

Com este estágio pretende-se adquirir conhecimento prático relativamente à aplicação de métodos de análise química na área da qualidade e segurança alimentar, desenvolvendo competências profissionais no que respeita à aplicação de técnicas instrumentais de análise.

Pretende-se ainda adquirir experiência em ambiente empresarial, trabalhando em equipa e avaliando e comparando o desempenho individual com o trabalho feito por analistas mais experientes.

2. Fundamentos teóricos

2.1. Metais nos alimentos

O organismo humano necessita de alguns metais para o seu correto funcionamento. A ausência de alguns deles pode ocasionar sérias doenças. Por outro lado, alguns metais de transição, quando presentes no organismo humano, podem causar intoxicações. São exemplos clássicos, o arsênio, o chumbo e o mercúrio.

Grande parte dos elementos químicos que compõem a tabela periódica está presente no organismo humano. Tais elementos aparecem de forma combinada nas mais variadas substâncias, desempenhando diferentes funções. É interessante destacar que tais substâncias estão em contínuo estado de rotatividade, sendo formadas e consumidas a velocidades que variam de frações de segundos até anos ^[17].

É importante destacar, ainda, outros metais, sem os quais a vida humana não seria possível. Entre eles estão o crómio, o manganês, o níquel, o cobre e o zinco, envolvidos em processos metabólicos que regulam a produção de energia e o bom funcionamento do corpo humano. A falta ou o excesso de metais ou de quaisquer outros elementos químicos pode ser prejudicial à saúde ^[18].

2.1.1. Minerais

Os minerais são substâncias inorgânicas necessárias à saúde do corpo humano e estão presentes nos tecidos corporais em pequenas quantidades. São utilizados pelo organismo para ativar enzimas, hormonas e outras moléculas que desempenham funções importantes para o organismo. Como não podem ser sintetizados pelo organismo, os minerais são obtidos através da alimentação ^[19].

Os minerais podem ser classificados em dois grupos, de acordo com a quantidade necessária de ingestão. Assim, são chamados de macrominerais quando são necessários em quantidades maiores que 100 mg/dia e os microminerais (ou oligoelementos) quando são necessários em quantidades menores que 100 mg/dia. São exemplos de macrominerais o cálcio, o magnésio, o sódio, o potássio, o fósforo e o cloro. Estes minerais estão presentes em praticamente todas as células do corpo humano, mantendo a sua homeostasia. São considerados como microminerais (ou oligoalimentos) o ferro, o crómio, o cobre, o iodo, o selénio, o manganês, o zinco e o molibdénio ^[19].

2.1.1.1. Cálcio

O cálcio é de vital importância para o homem, sendo o elemento químico mais abundante no organismo, constituindo cerca de 2% do peso de uma pessoa. Estima-se que cerca de 99% do cálcio encontra-se presente nos ossos e dentes e o restante 1% está no sangue. Desta forma, este metal é o responsável pela formação óssea e dentária, além de atuar na coagulação sanguínea juntamente com a vitamina K ^[20].

Este mineral assiste no processo de relaxamento e contração dos músculos e na transmissão de estímulos nervosos, ajuda a combater a hipertensão e regula os batimentos cardíacos.

Sendo que as funções fisiológicas do cálcio são vitais para o equilíbrio do organismo, segundo a FAO (*Food and Agriculture Organization*), é necessária uma ingestão de cálcio que varia entre 1000 e 1300 mg/dia para indivíduos adultos ^[21]. No entanto, não é necessária uma ingestão exagerada de alimentos que o possuem, uma vez que o organismo absorve 10 – 30 % do cálcio que é consumido. Como tal, uma ingestão deste metal muito acima do recomendado pode trazer complicações, como a calcificação exagerada dos ossos, a dificuldade do organismo em absorver ferro, falência renal e em casos extremos, problemas de foro mental.

Quando existe insuficiência de cálcio, quer por má alimentação ou por questões hormonais, para manter os níveis normais deste mineral no sangue, o corpo vai desmineralizando os ossos, sendo que uma dieta adequada em teores de cálcio é um fator muito importante para a manutenção de um esqueleto saudável ^[19, 22].

Um dos fatores conhecidos que mais dificultam a absorção de cálcio pelo organismo é o sódio. Está comprovado que quando existe uma maior ingestão de sódio no organismo os níveis de excreção de cálcio tendem a aumentar, presumidamente devido à competição entre estes dois metais aquando da absorção nos tubos renais ^[23].

A deficiência de cálcio no organismo pode causar diversos problemas para a saúde, não só através das doenças relacionadas aos ossos (osteoporose, raquitismo e osteomalacia), mas também pelo desequilíbrio hormonal, que pode desencadear aumento de peso através do inchaço dos tecidos de gordura.

Relativamente às principais fontes deste mineral temos o leite e seus derivados (queijo, manteiga, iogurte, etc.), os vegetais de folhagem verde-escura (hortelã, brócolos, espinafres, ect.), peixes, ostras, amêndoas e frutas.

É importante referir, que alguns alimentos consumidos juntamente com cálcio podem prejudicar a sua absorção, como é o caso dos alimentos ricos em oxalato, o inibidor mais potente da absorção deste mineral. O oxalato encontra-se em altas concentrações nos espinafres e em concentrações mais reduzidas no feijão. Também o ácido fítico, porém com menor potência, é um inibidor da absorção de cálcio. O ácido fítico pode ser encontrado em grãos como o trigo e o

centeio, no entanto, as leveduras possuem uma enzima denominada fitase que degrada o ácido fítico, reduzindo o seu teor em pães e outros alimentos fermentados^[19].

Todavia, existem outros componentes que aumentam a absorção do cálcio no organismo, como a vitamina D (o sol é a melhor fonte para obtenção de vitamina D) e a lactose presente no leite^[24].

2.1.1.2. Zinco

O zinco é um mineral essencial presente em todos os tecidos e fluidos do organismo e a sua quantidade foi estimada em 2 g, num adulto.

Este elemento está envolvido num elevado número de reações enzimáticas (mais de trezentas) na síntese e degradação de hidratos de carbono, lípidos, proteínas e ácidos nucleicos, bem como no metabolismo de alguns micronutrientes. O zinco contribui para a manutenção da integridade das células e dos órgãos porque estabiliza os componentes da estrutura celular e das membranas. Além disso, tem um papel fundamental na expressão génica e no sistema imunitário^[25]. Marca presença em todos os órgãos, estando particularmente concentrado no pâncreas, no fígado, na pele e nos fâneros (cabelos, pelos e unhas).

As carnes vermelhas, os cereais integrais e os legumes e leguminosas são os alimentos que fornecem o zinco em maiores concentrações. Este metal também pode ser encontrado em peixes, raízes e tubérculos, vegetais de folha verde e frutas, ainda que em concentrações mais modestas. As gorduras e óleos, o açúcar e o álcool têm um teor muito reduzido de zinco. Sabe-se que o organismo aproveita apenas entre 5 a 10% do zinco ingerido através da alimentação. Esta razão deve-se à sua biodisponibilidade e de existirem substâncias presentes na alimentação que modificam a sua absorção, tais como, as fibras, o álcool e os contraceptivos orais, por exemplo, estes são bons inibidores da sua absorção^[25].

A deficiência do zinco pode causar vários problemas para a saúde como a desaceleração do crescimento, atraso na maturidade sexual, níveis baixos de insulina, perda de visão (causa alterações na retina), perda de apetite, cicatrização lenta, diarreia, náuseas e fragilidade do sistema imunitário. As deficiências de zinco estão associadas a distúrbios do intestino que interferem com a absorção dos alimentos, alcoolismo e doenças debilitantes cónicas.

Apesar de não serem muito frequentes, segundo a FAO, já foram reportados alguns casos de intoxicação por ingestão exagerada de zinco (entre 4 a 8 gramas). Nestes casos os sintomas foram febre, náuseas, vômitos e diarreia.

2.1.1.3. Sódio e Potássio

O sódio tem um papel importante no balanço hídrico da água corporal. É extremamente importante para manter o volume de fluidez corporal e um normal funcionamento das células [26].

Existem vários tipos de transporte transmembranar que dependem de energia na forma de ATP. Um dos exemplos mais importantes é a bomba de Na⁺ ou Na⁺/K⁺ - ATPase existente ao nível da membrana plasmática nos tecidos animais. Este transportador ubíquo tem como função o transporte de 3 iões Na⁺ para fora da célula e de 2 iões K⁺ para dentro da célula, contra os respetivos gradientes iónicos, onde a concentração intracelular de Na⁺ é mais baixa e a de K⁺ é mais alta relativamente ao meio extracelular, e está acoplado à hidrólise de uma molécula de ATP. Desta forma, no meio intracelular, é mantida uma concentração baixa de Na⁺ e uma concentração alta de K⁺. Por outro lado, é criado um potencial elétrico transmembranar pelo facto de se dar um transporte desigual do número de cargas para cada um dos lados da membrana (3 cargas positivas para fora e 2 cargas de igual sinal para dentro). Além disso, este transportador é essencial para a condução do potencial de ação ao nível das células nervosas [27].

As necessidades de sódio são muito reduzidas e largamente cobertas pela alimentação, sendo que naturalmente, o sódio pode ser encontrado numa grande diversidade de alimentos como carnes, leite e marisco [25]. Este mineral pode ser incluído na alimentação como ingrediente, como por exemplo o sal de cozinha (cloreto de sódio) ou bicarbonato de sódio adicionado no processamento ou durante a confeção do alimento [28]. Foi comprovado que os alimentos com maior teor de sódio são os processados, como é o caso do pão, carnes processadas e petiscos [29, 30]. Nos molhos e temperos também são frequentemente encontrados altos teores de sódio.

A deficiência de sódio é rara, sendo observada apenas em dietas excessivamente condicionadas em sal. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), é recomendado a um adulto que este consuma menos de 2 g de sódio, ou seja, menos de 5 g de sal por dia [31].

Em indivíduos saudáveis, a excreção urinária é o principal mecanismo de manutenção do equilíbrio do sódio, uma vez que quase 100% do sódio ingerido é absorvido pelo organismo [31].

Relativamente ao potássio, vários alimentos contém este metal como é o caso de frutas, nomeadamente a banana e o abacaxi, e os vegetais, como a salsa e os espinafres [32]. Apesar de em menor quantidade, as carnes, o leite e os sumos à base de citrinos são também uma boa fonte de obtenção deste mineral.

A ingestão de potássio é de grande importância para o organismo existindo problemas para a saúde caso este mineral seja ingerido em excesso ou em deficiência. Quando este mineral é ingerido em pouca quantidade, pode provocar hipertensão e possivelmente acidente vascular cerebral. No entanto, caso ingerido em quantidades superiores às recomendadas (3510 mg/dia para um adulto) [33] causa toxicidade, denominada de hipercaliemia ou hiperpotassemia. O excesso de potássio pode não ter só efeitos na função metabólica mas também na transmissão

de impulso nervoso, na contração muscular e, principalmente no ritmo cardíaco, podendo levar ao desenvolvimento de arritmias.

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a população em geral consome mais sódio do que o aconselhável e menos potássio do que o necessário a uma vida saudável [34].

2.1.2. Metais Tóxicos

Os metais tóxicos são aqueles que não têm função conhecida no organismo e que são muito prejudiciais para todos os seres vivos, mesmo em concentrações extremamente baixas. A distinção entre os metais que são essenciais e aqueles que são tóxicos, numa dieta humana, é complicada, uma vez que todos os metais são tóxicos quando absorvidos pelo organismo em concentrações elevadas [35].

Os metais tóxicos, que causam maior dano à saúde são o cádmio, chumbo e mercúrio, que apesar de não serem parte constituinte dos seres vivos, causam toxicidade por apresentarem estruturas químicas semelhantes aos metais essenciais, mimetizando e substituindo estes em inúmeras reações enzimáticas e processos metabólicos.

Muitos metais são convertidos no solo por microorganismos, na sua forma orgânica e são absorvidos pelas plantas. Estas são ingeridas posteriormente por outros animais como aves, ovinos e caprinos, resultando na sua entrada na cadeia alimentar. No meio aquático são bioconcentrados pelos organismos aquáticos, especialmente os moluscos. O poder de bioconcentração varia com as espécies, ocorre em ambiente aquático e terrestre, e em cada indivíduo varia nos diferentes órgãos. Alguns metais podem ainda sofrer bioamplificação, ou seja, verifica-se a acumulação destes compostos ao longo da cadeia alimentar. O fenómeno de bioamplificação assume um elevado risco para os animais no topo da cadeia, como o homem, e a sua magnitude varia com o tipo de metal pesado.

Como descrito no ponto 1.2.2, a União Europeia, por via do regulamento (CE) nº 1881/2006, fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios, nomeadamente o cádmio e o chumbo, com a finalidade de proteger a saúde pública e manter os contaminantes a níveis que sejam aceitáveis do ponto de vista toxicológico [11].

Neste trabalho foram determinados dois metais tóxicos, o cádmio e o chumbo por espectroscopia de absorção atómica com câmara de grafite.

2.1.2.1. Cádmio

O cádmio sofre uma bioacumulação em plantas aquáticas, invertebrados, peixes e mamíferos onde a alimentação é a principal fonte de exposição ao cádmio para a população geral e não fumadores.

Apesar de estar presente em todos os alimentos, este metal, encontra-se em concentrações muito baixas. Na Tabela 3 estão representados os níveis de cádmio presente em alguns alimentos.

Apesar das carnes, peixes, ovos e laticínios conterem pouco cádmio, os órgãos internos, especialmente fígado e os rins, podem conter concentrações mais elevadas. Normalmente, os produtos vegetais contêm mais cádmio que os produtos de origem animal. O hábito de fumar aumenta a exposição ao cádmio já que as folhas de tabaco acumulam naturalmente altas quantidades do metal [37].

Tabela 3 - Teores de cádmio detetados em alguns alimentos [36].

Alimento	Gama de teores
Leite	<10 µg/kg
Ovos	<10 µg/kg
Carne (vaca)	<10 µg/kg
Pescado	4,1 – 14,3 µg/kg
Salmonete	7,6 – 28,9 µg/kg
Vieira	3,2 – 66 mg/kg
Ostra	0,4 – 40 mg/kg
Fruta	10 – 100 µg/kg
Couve	2 – 150 µg/kg
Batata	5 – 180 µg/kg
Cenoura	1 – 220 µg/kg
Feijão	20 – 80 µg/kg
Arroz	<1 – 310 µg/kg
Trigo	<5 - 230 µg/kg

Apesar de a intoxicação de cádmio poder ocorrer por via respiratória, digestiva e dérmica, tem-se que a fração do metal que é absorvido por via cutânea é mínima e de pouca significância. Assim, pode dizer-se que o cádmio pode ser absorvido maioritariamente por via respiratória (através da inalação de partículas que estão no fumo do tabaco e no ar) e por via digestiva (através da ingestão de água e alimentos contaminados).

Através da alimentação, um indivíduo absorve entre 1 a 3 µg de cádmio. Assim, um indivíduo que fume um maço de cigarros por dia, vai absorver sensivelmente o dobro de cádmio que um indivíduo não fumador [36, 38].

Dependendo dos hábitos alimentares, das condições ambientais em que o alimento foi produzido, das técnicas utilizadas no processo de fabrico e das condições de armazenamento, os níveis de cádmio ingeridos variam [39, 40].

São mencionados pela ATSDR, valores de ingestão média de cádmio para um adulto, cerca de 30 µg/dia, dos quais 1 a 3 µg são absorvidos [36].

Devido à dieta, a exposição ao cádmio pode ocorrer a longo prazo, tendo como consequência a acumulação deste metal no organismo e apesar de não apresentar funções fisiológicas, interfere com as funções fisiológicas de outros metais, como o caso do zinco, por permanecer no organismo durante longos anos, sendo considerado por isso um metal extremamente tóxico [36, 41].

Da exposição a este metal pode surgir toxicidade aguda, proveniente da exposição a níveis elevados de cádmio, pela ingestão de sais de cádmio ou inalação de poeiras e fumos resultantes da combustão de materiais contendo este metal [37, 42]. Os sintomas deste tipo de intoxicação podem ser náuseas fortes, diarreia e contrações abdominais e em casos mais graves pode levar a falência renal com depressão cardiopulmonar e consequente morte. Se a exposição for prolongada, pode haver toxicidade crónica, tendo como consequência lesões sérias em vários órgãos e tecidos, entre os quais, testículos, pâncreas glândula supra-renal, tireoide, ossos, sistema nervoso central e pulmões. Apesar de poder afetar todos estes órgãos, os órgãos-alvo da toxicidade do cádmio são os rins (causando degeneração e atrofia dos túbulos proximais e em situações mais graves a fibrose intersticial do rim) e o fígado (necrose dos hepatócitos, variações metabólicas e peroxidação membranar). A EPA (Agência de Proteção Ambiental) classificou este metal como possível agente cancerígeno por inalação [44]. A toxicidade deste metal é largamente inibida pela presença de selénio, zinco e cobalto [45].

Na Tabela 4 estão representados os teores máximos de cádmio em alimentos fixados pela União Europeia, segundo o regulamento N^o 488/2014 da Comissão de 12 de Maio de 2014 que altera o regulamento (CE) N^o 1881/2006 no que respeita aos teores máximos de cádmio nos géneros alimentícios [43].

Tabela 4 - Teores máximos de Cádmio admissíveis em géneros alimentícios apresentados no Regulamento N.º 488/2014 da Comissão de 12 de Maio de 2014 ^[43].

Géneros alimentícios	Teores máximos de Cádmio (mg/kg de peso fresco)
Produtos hortícolas e frutos, com exceção de raízes e tubérculos, tubérculos, produtos hortícolas de folha, plantas aromáticas frescas, couves de folha, produtos hortícolas de caule, cogumelos e algas	0,050
Raízes e tubérculos (exceto aipo-rábano, pastinagas, salsifis e rábanos), produtos hortícolas de caule (com exceção de aipos). No caso das batatas, o teor máximo aplica-se a batatas descascadas	0,10
Produtos hortícolas de folha, plantas aromáticas frescas, couves de folha, aipos, aipo-rábano, pastinagas, salsifis e os seguintes cogumelos: <i>Agaricus bisporus</i> (cogumelo comum), <i>Pleurotus ostreatus</i> (pleuroto) e <i>Lentinula edodes</i> (“shiitake”)	0,20
Cogumelos, com exceção dos referidos no ponto anterior	1,0
Grãos de cereais, com exceção de trigo e arroz	0,10
Grãos de trigo, grãos de arroz, sêmea de trigo, gérmen de trigo para consumo direto e grãos de soja	0,20
Carne (com exceção de miudezas) de bovino, ovino, suíno e aves de capoeira	0,050
Carne de cavalo, com exceção de miudezas	0,20
Fígado de bovino, ovino, suíno, aves de capoeira e cavalo	0,50
Rim de bovino, ovino, suíno, aves de capoeira e cavalo	1,0
Parte comestível do peixe, com exceção das espécies referidas nos pontos três próximos pontos	0,050
Parte comestível dos seguintes peixes: carapau (espécie <i>Scomber</i>), atum (espécies <i>Thunnus</i> , <i>Katsuwonus pelamis</i> , <i>Euthynnus</i>) e <i>Sicyopterus lagocephalus</i>	0,10
Parte comestível dos seguintes peixes: judeu (espécie <i>Auxis</i>)	0,15
Parte comestível dos seguintes peixes: biqueirão (espécie <i>Engraulis</i>) espadarte (<i>Xiphias gladius</i>) sardinha (<i>Sardina pilchardus</i>)	0,25

Crustáceos: músculo dos apêndices e do abdómen. No caso dos caranguejos e crustáceos similares (Brachyura e Anomura), a parte comestível dos apêndices	0,50
Moluscos bivalves e cefalópodes (sem vísceras)	1,0
Suplementos alimentares, com exceção dos suplementos referidos no ponto seguinte	1,0
Suplementos alimentares que consistam exclusiva ou principalmente em algas secas, produtos derivados de algas ou moluscos bivalves secos	3,0

2.1.2.2. Chumbo

O chumbo é libertado para o ambiente, na sua maioria, por fontes antropogénicas, principalmente através de atividade mineira, fábricas e atividades de construção. Apesar deste metal tóxico poder estar presente na atmosfera na forma particulada, no solo devido à precipitação atmosférica e na água por meio da sua dissolução a partir de fontes naturais, como soldas, acessórios e conexões contendo chumbo, a principal fonte de exposição ao chumbo resulta do consumo alimentar ^[46].

O chumbo está presente em todos os alimentos e os seus níveis variam muito dependendo da região, sendo superiores em ambientes onde a poluição ambiental é mais intensa ^[47]. Na Tabela 5 são representados os níveis de chumbo detetados em alguns alimentos.

Tabela 5 - Teores de chumbo detetados em alguns alimentos ^[3].

Alimento	Gama de teores
Leite	<0,01 – 0,08 mg/kg
Fruta enlatada	0,04 – 10,0 mg/kg
Fruta fresca	<0,01 – 0,76 mg/kg
Vegetais enlatados	0,01 – 1,5 mg/kg
Vegetais frescos	<0,01 – 1,5 mg/kg
Bebidas alcoólicas	50 – 100 µg/L
Cereais	<0,01 – 0,81 mg/kg
Carne e peixe	<0,01 – 0,70 mg/kg

A absorção de chumbo por via digestiva depende maioritariamente de fatores relacionados com a alimentação, a ingestão de proteínas e a presença de cálcio, ferro e fósforo ^[48]. A deficiência destes nutrientes aumenta a absorção do metal. Assim sendo, a ingestão média diária de um adulto é de 0,1 a 2 mg de chumbo, dos quais apenas 10% é absorvido pelo

organismo. No entanto, esta percentagem aumenta significativamente nas crianças onde o valor absorvido é de 40% [48], especialmente se a dieta for rica em açúcares e pobre em cálcio, ferro e fósforo, como já referido.

Os cosméticos e os remédios caseiros são também uma fonte de exposição ao chumbo. Este metal está presente no tabaco em concentrações que variam entre os 2,5 e os 12,2 µg/cigarro, dos quais, entre 2 a 6% podem ser inaladas pelo fumador [46].

O chumbo está presente em todos os tecidos e órgãos do organismo, em concentrações que variam dos 100 aos 400 mg num homem adulto, principalmente em trabalhadores que são vítimas de intoxicação ocupacional. Os mecanismos de toxicidade deste metal, envolvem processos bioquímicos fundamentais, que incluem a capacidade do chumbo de inibir ou de imitar a ação do cálcio e de interagir com proteínas [49]. A maioria do chumbo ingerido vai acumular-se nos rins e no fígado [50].

Apesar de muito tóxico, a maior parte do chumbo que é ingerido é excretado por diversas vias, sendo de destacar as vias renal e gastrointestinal.

O chumbo afeta excepcionalmente o cérebro e o sistema nervoso em geral, onde em situações extremas de dosagem elevada pode levar a edema e hemorragia cerebral, mas não só, afeta o sangue, os rins, os sistemas digestivo e reprodutor. É um agente teratogénico e causador de hipertensão [51, 52]. A ingestão de chumbo pode ainda provocar encefalopatia, levando a disfunções comportamentais e psicológicas, de forma especial em crianças devido à sua maior vulnerabilidade aos efeitos do metal [49].

A Agência Internacional de Pesquisa em Cancro (IARC) classifica os compostos inorgânicos de chumbo como potenciais cancerígenos para o ser humano.

A Comissão de 16 de Dezembro de 2006, a União Europeia formulou o Regulamento (CE) N^o1881/2006, onde são apresentados os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios, onde constam os teores máximos de chumbo em alimentos [11] (Tabela 6).

Tabela 6 - Teores máximos de Chumbo admissíveis em géneros alimentícios apresentados no Regulamento N^o 1881/2006 da Comissão de 19 de Dezembro de 2006 [11].

Géneros alimentícios	Teores máximos de Chumbo (mg/kg de peso fresco)
Leite cru, leite tratado termicamente e leite para o fabrico de produtos lácteos	0,020
Fórmulas para lactentes e fórmulas para transição	0,020
Carne (com exceção de miudezas) de bovino, ovino, suíno e aves de capoeira	0,10

Miudezas de bovino, ovino, suíno e aves de capoeira	0,50
Parte comestível do peixe	0,30
Crustáceos: parte comestível dos apêndices e do abdómen. No caso dos caranguejos e crustáceos similares (Brachyura e Anomura), a parte comestível dos apêndices.	0,50
Moluscos bivalves	1,5
Cefalópodes (sem vísceras)	1,0
Leguminosas frescas, cereais e leguminosas secas.	0,20
Produtos hortícolas, com exceção de brássicas, produtos hortícolas de folha, plantas aromáticas frescas, cogumelos e algas. No caso das batatas, o teor máximo aplica-se a batatas descascadas.	0,10
Brássicas, produtos hortícolas de folha e os seguintes cogumelos: Agaricus bisporus (cogumelo comum), Pleurotus ostreatus (pleuroto) e Lentinula edodes («shiitake»).	0,30
Frutos, com exceção de bagas e frutos pequenos	0,10
Bagas e frutos pequenos	0,20
Óleos e gorduras, incluindo a matéria gorda do leite	0,10
Sumos de frutos, sumos de frutos concentrados reconstituídos e néctares de frutos	0,050
Vinho (incluindo vinho espumante, com exceção do vinho licoroso), sidra, perada e vinho de frutos	0,20
Vinho aromatizado, bebidas aromatizadas à base de vinho e cocktails aromatizados de produtos vitivinícolas	0,20
Suplementos alimentares	3,0

3. Técnicas analíticas para a determinação de metais em alimentos

A determinação de metais em alimentos pode ser feita com recurso a diversas técnicas analíticas, como a espectrofotometria atômica (ponto 3.1), nomeadamente a espectrofotometria de absorção atômica (AAS) e a espectrofotometria de emissão atômica (AES), a eletroforese capilar, a cromatografia iónica, os métodos eletroquímicos e a espectroscopia de infravermelho.

No âmbito alimentar, são passíveis de serem detetados através de eletroforese capilar, iões de metais alcalinos e metais alcalino-terrosos, utilizando detetores ultravioleta (UV) e de fluorescência ^[53]. Através da eletroforese capilar, podem ser determinados metais como o cálcio, o potássio, o sódio, o magnésio ^[54], cobre, ferro, zinco, níquel e o cobalto ^[55]. Esta técnica tem como vantagens uma boa eficiência de resolução em tempos de análise reduzidos, a necessidade de pouca quantidade de amostra, o baixo custo dos materiais descartáveis e a possibilidade de deteção e de injeção em fluxo ^[56].

Para a indústria alimentar, são passíveis de serem determinados por cromatografia iónica metais em forma de iões, tais como o cobre, o níquel, o zinco, o manganês, o cobalto, o ferro ^[57], o cádmio e o chumbo ^[58]. Este método é vantajoso pelo facto de haver simplificação da determinação de espécies iónicas em simultâneo.

Apesar de não serem muito usuais, as técnicas voltamétricas têm vindo a ganhar algum peso, em particular a voltametria de redissolução anódica, por fornecem bons resultados no que respeita à determinação de metais em alimentos. As técnicas de voltametria de redissolução anódica têm demonstrado elevado potencial na determinação de metais tóxicos vestigiais, como o mercúrio ^[59], o chumbo ^[60], o cádmio ^[61], o arsénio ^[62] e o estanho ^[63], bem como metais essenciais, como o ferro ^[64], zinco ^[65] e cobre ^[66], níquel e cobalto ^[67] em produtos alimentares. A voltametria de redissolução é um método eletroquímico que se destaca por ser um método rápido, barato, sensível e preciso ^[68].

A espectroscopia de infravermelho é uma alternativa viável para a determinação dos elementos minerais dos alimentos face aos métodos usualmente utilizados. Este método permite a determinação do conteúdo mineral de amostras sólidas e líquidas sem que haja pré-tratamento da amostra. A espectroscopia de infravermelho é uma técnica que permite a determinação de vários metais em alimentos, como o cálcio, o potássio, o ferro, o magnésio, o sódio e o zinco ^[69], ^{70, 71}. Como vantagens tem o facto de ser não destrutiva, rápida e de baixo custo. No entanto, a sua aplicação na determinação de minerais é limitada, principalmente em elementos presentes em quantidades vestigiais ^[72].

3.1. Espectrofotometria Atômica

A espectrofotometria de absorção atômica e a espectrofotometria de emissão atômica são técnicas que podem ser utilizadas para determinar o teor de metais em alimentos.

A técnica analítica de espectrofotometria atômica pode ser utilizada na determinação qualitativa e quantitativa de mais de 70 elementos químicos. Em termos de sensibilidade, estes métodos têm a capacidade de atingir gamas de concentrações na ordem de partes por milhão (ppm) e de partes por bilhão (ppb). Estes métodos têm como vantagens a rapidez, a elevada seletividade e, dependendo dos métodos, custos reduzidos [73].

A determinação espectrofotométrica de espécies atômicas apenas pode ser realizada numa mistura gasosa, na qual os átomos individuais ou íons elementares estão convenientemente separados uns dos outros.

Os equipamentos modernos de espectrofotometria atômica, que são atualmente utilizados, tem a capacidade de medir tanto a radiação absorvida por uma espécie atômica como a que é emitida por outra espécie atômica. Associado ao núcleo, cada elemento químico tem um número específico de elétrons. Diz-se que um átomo se encontra no estado fundamental, quando este se apresenta na sua configuração mais estável. Ao ser aplicada uma determinada energia sobre o átomo, e esta é absorvida, um dos elétrons mais externos é promovido a um nível de energia superior, ficando o átomo com uma configuração eletrônica menos estável, ou seja, atinge o seu estado excitado. O átomo tem tendência a voltar para o seu estado de menor energia, o estado fundamental, processo no qual liberta a energia absorvida [73].

A atomização é o primeiro processo a tomar lugar em qualquer procedimento de espectrofotometria atômica, no qual, a amostra é volatilizada e decomposta até que sejam formados átomos e íons numa mistura gasosa. A sensibilidade, a precisão e a exatidão do método são largamente influenciados pela eficiência e reprodutibilidade da fase de atomização, fazendo desta, conseqüentemente, uma fase crítica na espectroscopia atômica [73].

Na Tabela 7 estão listados os vários métodos utilizados para atomizar amostras para espectrofotometria atômica. Os atomizadores de chama e eletrotérmicos são utilizados em espectrofotometria de absorção atômica, enquanto os atomizadores de plasma acoplado indutivamente são utilizados em espectrofotometria de emissão e de massa.

Tabela 7 - Métodos de atomização mais utilizados em espectrofotometria atômica [73].

Classificação dos métodos de espectrofotometria atômica			
Método de atomização	Temperatura típica de atomização, °C	Tipo de espectrofotometria	Nome comum e abreviatura

Plasma	6000-8000	Emissão	Espectrofotometria atômica com plasma acoplado indutivamente (ICP-AES)
		Massa	Espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS)
Chama	1700-3150	Absorção	Espectrofotometria de absorção atômica (FAAS)
		Emissão	Espectrofotometria de emissão atômica (FAES)
		Fluorescência	Espectrofotometria de fluorescência atômica (AFS)
Eletrotérmico	1200-3000	Absorção	Espectrofotometria de absorção atômica eletrotérmica ou câmara de grafite (GFAAS)
		Fluorescência	Espectrofotometria de fluorescência atômica (AFS) eletrotérmica

Segundo F. James Holler e Stanley R. Crouch, a partir do momento em que a amostra é convertida em átomos ou iões gasosos, podem ser realizados diversos tipos de espectrofotometria, nomeadamente, absorção, emissão, massa e fluorescência.

Para a determinação do conteúdo mineral existente nos alimentos são a espectrofotometria de absorção atômica (FAAS), a espectrofotometria de absorção atômica com câmara de grafite (GFAAS), a espectrofotometria atômica com plasma acoplado indutivamente (ICP-AES) e a espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) [2, 74].

Na escolha do método analítico apropriado para a caracterização das amostras em estudo, alguns dos seguintes fatores são tidos em consideração [75]:

- o tipo de informação que se pretende obter;
- a quantidade de amostra disponível e a proporção do(s) constituinte(s) a analisar;
- a exatidão e a precisão do método analítico;
- as interferências analíticas e o seu controlo;
- as dificuldades com possíveis contaminações;
- o tempo necessário para analisar cada amostra;
- o custo da análise de cada elemento por amostra.

Para que os métodos sejam utilizados de forma a explorar convenientemente as suas potencialidades, é fundamental o conhecimento dos princípios dos fenómenos físicos presentes, as vantagens e, principalmente as limitações mais relevantes de cada método de forma a serem criadas as condições experimentais necessárias para a sua aplicação. Tendo em isto em conta, o objetivo é utilizar o método mais acessível e que possa satisfazer as exigências da análise. Na Tabela 8 são comparadas algumas das características de desempenho destas técnicas [2].

Tabela 8 - Comparação das técnicas de espectrofotometria atômica [2].

Técnica	Multi-elemento	Limites de detecção (ng/mL)	Efeitos de matriz	Seletividade	Precisão (%)	Exatidão	Custo
FAAS	Não	1-100	Pequenos	Boa	0,1-1	Boa	Baixo
GFAAS	Não	0,001-1	Pequenos	Boa	1-5	Boa	Moderado
ICP-AES	Sim	1-100	Pequenos	Moderada	0,1-1	Boa	Moderado
ICP-MS	Sim	0,001-0,1	Moderados	Boa ^a	0,2-2	Boa	Elevado

^a seletividade isotópica

Através da observação da Tabela 8, pode dizer-se que as técnicas de ICP-AES e ICP-MS têm a grande vantagem de permitirem a análise de vários elementos numa só análise e que as técnicas de FAAS e GFAAS não o permitem, fazendo dos primeiros bastante adequados para a determinação de metais em amostras alimentares. No que respeita aos limites de detecção, estes são iguais para as técnicas de FAAS e ICP-AES, sendo que para as técnicas de GFAAS e ICP-MS são muito idênticos. Apesar de ser passível a análise de multi-elemento e de ter limites de detecção reduzidos, a técnica de ICP-MS é monetariamente desfavorável. Assim, quando se pretende a determinação de poucos elementos, os métodos de espectrofotometria de absorção atômica (AAS) são os mais apropriados e usuais por terem um custo reduzido, mesmo que não tenham a capacidade de determinação multi-elemento.

Espectrofotometria de absorção atômica (AAS)

Na determinação de metais em alimentos, a espectrofotometria de absorção atômica é a técnica recorrente.

Na espectroscopia de absorção atômica, o vapor do analito é irradiado com uma fonte externa de radiação (visível ou ultravioleta). Se a fonte de radiação estiver na frequência correta, pode ser absorvida pelos átomos do analito e promove-os para estados excitados, permitindo a determinação do analito através da medição da radiação que foi absorvida. Esta técnica recorre a um detetor que mede a radiação que é transmitida pela amostra, num determinado comprimento de onda e compara-a com a radiação original que passou através da amostra, com o mesmo comprimento de onda, permitindo a medição da quantidade de energia, na forma de fótons de luz, que é absorvida pela amostra. Cada elemento químico possui o seu próprio padrão distinto de comprimentos de onda, uma vez que cada átomo tem uma configuração própria de eletrões na sua camada externa. Sendo a absorvância diretamente proporcional à concentração,

a concentração da solução amostra pode ser determinada fazendo uso de uma curva de calibração obtida a partir de padrões [76].

Para um espectrofotômetro de absorção atômica de feixe simples, a instrumentação é bastante rudimentar como demonstrado na Figura 2.

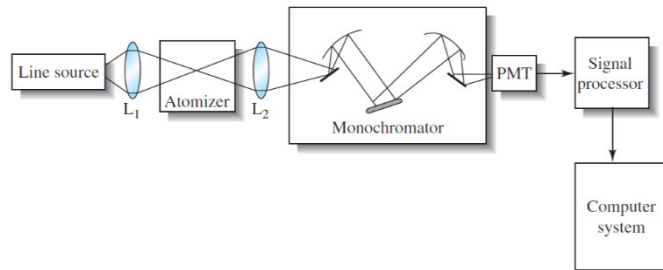


Figura 2 - Esquema de um espectrofotômetro de absorção atômica de feixe simples [76].

A maioria das medições em espectrofotometria de absorção atômica é feita com instrumentos equipados com monocromadores de ultravioleta/visível, utilizados num espectrofotômetro de absorção atômica de feixe duplo (Figura 3).

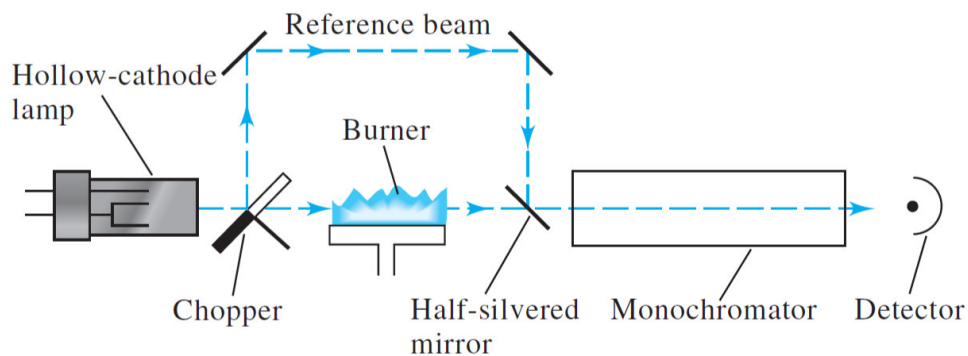


Figura 3 - Esquema de um espectrofotômetro de absorção atômica de feixe duplo [76].

A radiação proveniente da fonte é mecanicamente dividida em dois feixes por um *chopper* espelhado, um que passa através da chama e outro que a contorna. Os dois feixes voltam a convergir, com o auxílio de um semi-espelho, passando alternadamente pelo monocromador. A razão entre a referência e o sinal da amostra é amplificada e levada ao dispositivo de saída (medidor digital ou registrador potenciométrico) [77].

Para a espectrofotometria de absorção atômica, usualmente são utilizadas lâmpadas de cátodo oco (Figura 4) e as lâmpadas de descarga sem elétrodos (Figura 5) como fonte de radiação.

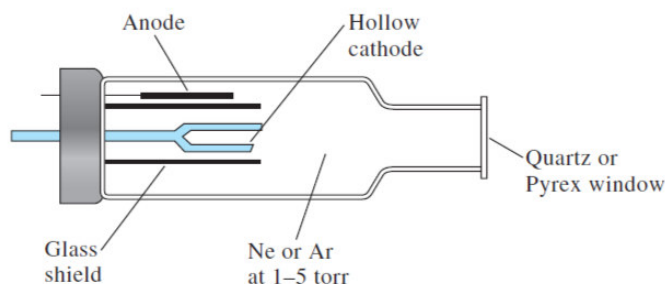


Figura 4 - Diagrama de uma lâmpada de cátodo oco [77].

As lâmpadas de cátodo oco consistem num ânodo de tungstênio e num cátodo cilíndrico selado num tubo de vidro que contém, no seu interior, um gás inerte (árgon, por exemplo) à pressão de 1 a 5 torr. O cátodo é fabricado a partir do metal a que se refere o analito, ou serve como suporte para o revestimento do próprio metal. Existem lâmpadas de cátodo oco para aproximadamente 70 elementos. O desenvolvimento de lâmpadas de cátodo oco foi um marco na evolução da espectroscopia de absorção atômica, na medida em que tornaram este, num método prático [73].

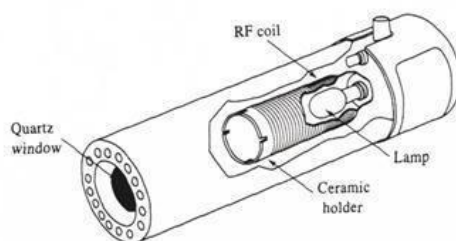


Figura 5 - Diagrama de uma lâmpada de descarga sem elétrodos [73].

Como já referido, para além das lâmpadas de cátodo oco, existem as lâmpadas de descarga sem elétrodos. Estas lâmpadas possuem intensidades de magnitude superiores que as suas homólogas. Este tipo de lâmpadas são constituídas por um tubo de quartzo selado, contendo um gás inerte (árgon, por exemplo), a uma pressão de poucos torr e uma pequena quantidade do analito metálico (ou o seu sal). Este tipo de lâmpadas tem a particularidade de não ter elétrodos. Em vez disso, a energia provém de um campo intenso de radiofrequência ou de radiação de micro-ondas [73].

Apesar das lâmpadas de cátodo oco serem as mais utilizadas em espectrofotometria de absorção atômica, para elementos como o arsénio, selénio e telúrio as lâmpadas de descarga sem elétrodos são mais interessantes por serem mais intensas em magnitude [73].

Dos métodos listados na Tabela 7, os mais utilizados são a espectrofotometria de absorção atômica com chama (FAAS) quando a concentração do analito é elevada ou por espectrofotometria de absorção atômica com câmara de grafite (GFAAS), quando as concentrações do analito são muito baixas. Uma vez, a capacidade de detecção de FAAS sendo adequada, deve-se sempre optar por esta técnica, devido à sua simplicidade, eficácia, rapidez, relativo baixo custo e menor sensibilidade a interferências (por exemplo a absorção não específica ou absorção de fundo), relativamente a técnica de GFAAS [2].

Para a determinação de alguns metais em alimentos, existem ainda duas outras técnicas de espectrofotometria atômica, a espectrofotometria de absorção atômica com geração de hidretos (HGAAS) que se aplica a elementos que formam hidretos covalentes voláteis como o arsênio e o estanho, por exemplo, e a espectrofotometria de absorção atômica com vapor frio, útil na determinação de elementos que são facilmente convertidos na sua forma volátil como o mercúrio [74, 78].

Apesar de só se conseguir determinar um elemento por análise, uma vez que cada elemento requer uma lâmpada diferente, as técnicas de espectrofotometria atômica são uma boa opção devido à sua simplicidade, eficácia e relativo baixo custo [73].

3.1.1. Espectrofotometria de Absorção Atômica com Chama (FAAS)

A espectrofotometria de absorção atômica com chama (FAAS) é atualmente a técnica de absorção atômica mais utilizada devido à sua eficácia, baixo custo, exatidão e seletividade e pelo facto de ser uma técnica simples, permitir que as determinações possam ser realizadas mesmo com executantes de experiência reduzida.

Em FAAS são utilizados atomizadores de chama que consistem num nebulizador pneumático que converte a solução-amostra num aerossol (uma suspensão de partículas num gás) que é posteriormente introduzida num queimador (Figura 6), onde o analito é dessolvatado, vaporizado e convertido em átomos livres [73].

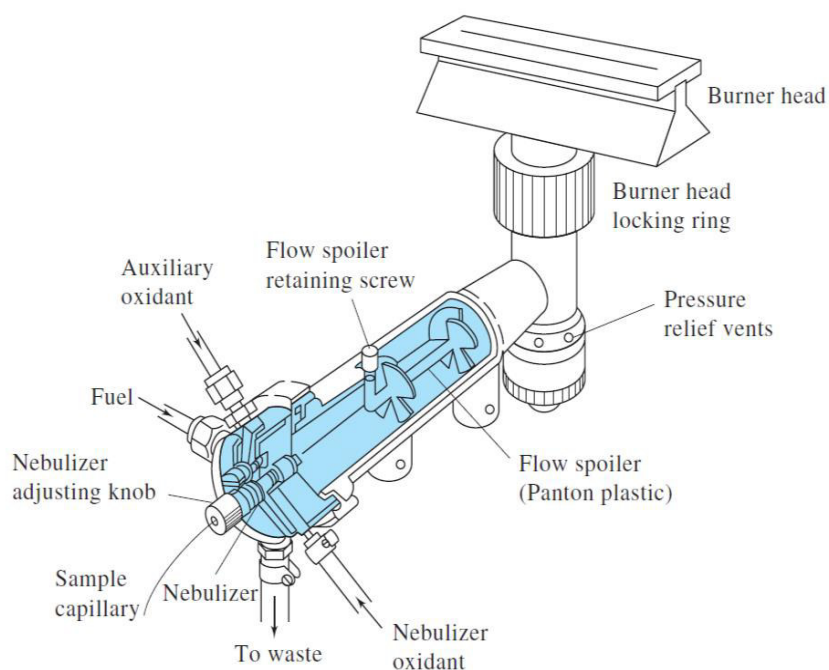


Figura 6 - Estrutura de um queimador de fluxo laminar utilizado em espectrofotometria de absorção atômica com chama [73].

Quando a amostra nebulizada é transportada para a chama (Figura 7), esta é dessolvatada na zona de combustão primária (1). As partículas sólidas resultantes são transportadas para a zona mais quente da chama, a zona intermédia (2), onde são convertidas em átomos gasosos [73], iões elementares e espécies moleculares. Os átomos, iões e moléculas, numa fase final, são levados para o limite da chama (3) onde são dispersos para a atmosfera. Onde a amostra se encontra atomizada, através da chama, passa um feixe de radiação com comprimento de onda específico para o elemento que se está a determinar, permitindo a determinação desse mesmo elemento.

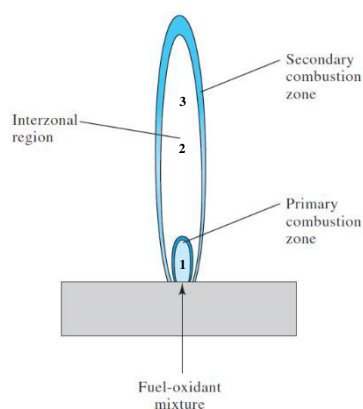


Figura 7 - Regiões da chama num queimador [73].

Na Tabela 9 estão listadas as chamas mais comumente utilizadas em espectroscopia atômica e o intervalo de temperaturas atingido em cada mistura. Normalmente, em FAAS a chama utilizada é de ar-acetileno ou de peróxido de azoto-acetileno. As temperaturas atingidas por estas misturas são suficientemente elevadas para que sejam obtidas boas atomizações para a maioria dos elementos que podem ser determinados por este tipo de espectrofotometria de absorção atômica e, não é demasiado elevada para que as interferências que possam ocorrer durante o processo de ionização sejam significantes [79].

Tabela 9 - Lista de chamas utilizadas em espectroscopia atômica [79].

Chamas utilizadas em espectroscopia atômica	
Combustível e Oxidante	Temperatura (°C)
*Gás/Ar	1700 – 1900
*Gás/O ₂	2700 – 2800
H ₂ /Ar	2000 – 2100
H ₂ / O ₂	2500 – 2700
+C ₂ H ₂ /Ar	2100 – 2400
+C ₂ H ₂ / O ₂	3050 – 3150
+C ₂ H ₂ /N ₂ O	2600 – 2800

*Propano ou gás natural

+Acetileno

A variação da temperatura da chama influencia fortemente os espectros de absorção. Sendo a atomização a parte onde ocorre a dessolvatação, vaporização e conversão a átomos livres, a sua eficiência é determinada em larga escala pela temperatura, onde temperaturas mais elevadas aumentam a população de átomos na chama, aumentando também a sensibilidade do método.

Esta técnica, como referido anteriormente, é extremamente utilizada na determinação de elementos minerais em alimentos, como o cálcio, o zinco, o potássio e o sódio [80].

3.1.2. Espectrofotometria de Absorção Atômica com Câmara de Grafite (GFAAS)

A espectrofotometria de absorção atômica com câmara de grafite pode também ser designada de espectrofotometria de absorção atômica com forno de grafite ou espectrofotometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica.

Na atomização eletrotérmica, a amostra é colocada dentro num tubo de grafite, o qual é submetido a um aquecimento progressivo previamente programado, onde ocorre a dessolvatação e volatilização da amostra, dando origem a uma nuvem densa de vapor atômico [2, 79]. O programa de temperaturas escolhido depende do elemento e da matriz da amostra a analisar e compreende quatro etapas de temperatura (Figura 8).

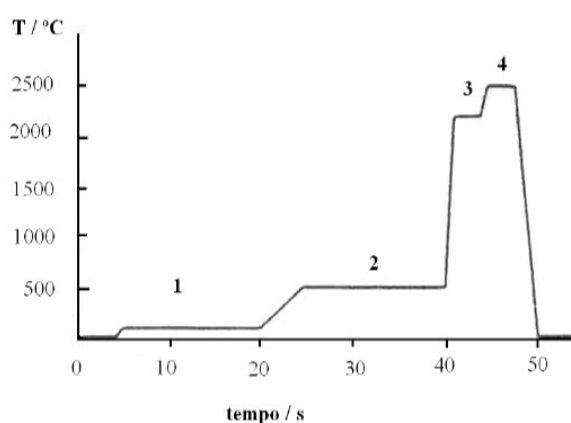


Figura 8 - Programa de temperaturas típico da atomização eletrotérmica.

Etapa 1- Secagem

Nesta etapa ocorre a evaporação do solvente. O aquecimento da amostra tem de ser suave (normalmente 110°C), uma vez que esta pode espalhar-se pelo tubo, tendo repercussões na sensibilidade e na reprodutibilidade dos resultados. Por vezes são utilizadas rampas de aquecimento, sendo o tempo de secagem selecionado de modo a que este atinja a sua temperatura de ebulição e seque a amostra lentamente.

Etapa 2 – Decomposição

Esta etapa tem como o objetivo a eliminação dos componentes de matriz. Assim, a temperatura vai aumentando, geralmente até os 1200 °C, incinerando a matéria orgânica.

Etapa 3 – Atomização

Num curto período de tempo (entre alguns milissegundos a segundos), o tubo de grafite é elevado a temperaturas que rondam os 2000 e os 3000 °C, provocando a vaporização e atomização da amostra. A atomização é a etapa mais importante.

Etapa 4 – Pirólise (limpeza)

São aplicadas, de modo a evitar o efeito de memória entre as amostras, temperaturas elevadas para serem eliminados os vapores constituintes da matriz [73, 81].

Na figura 9 esta a representação de um atomizador eletrotérmico.

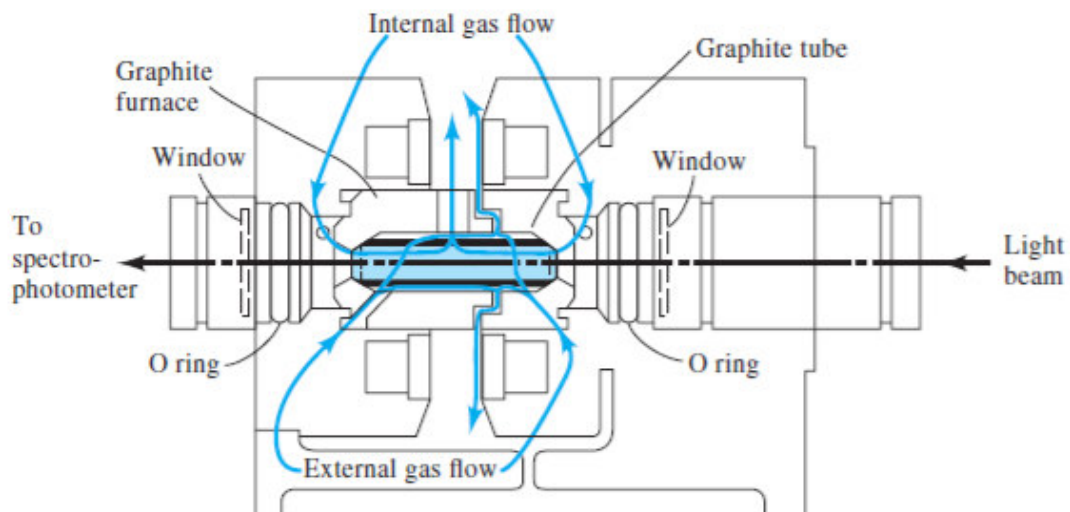


Figura 9 – Esquema de um corte transversal de um atomizador de câmara de grafite [73].

A radiação proveniente da fonte atravessa longitudinalmente a câmara de grafite, possibilitando a determinação do elemento de interesse [82].

A espectrofotometria de absorção atômica em câmara de grafite tem como vantagens o facto de utilizar volumes de amostra reduzidos (na gama dos microlitros), de ter limites de deteção muito baixos e de apresentar elevada sensibilidade. As desvantagens da GFAAS prendem-se com as interferências (físicas ou químicas), a vulnerabilidade a fenómenos de contaminação e, o tempo gasto na determinação de vários elementos por amostra, uma vez que cada elemento requer programas de tempo/temperatura específicos com ciclos de aquecimento que podem levar alguns minutos [83].

Neste tipo de espectrometria, as amostras são introduzidas na câmara de grafite em forma de solução, no entanto, já existe instrumentação onde podem ser utilizadas amostras sólidas [2, 84].

A GFAAS é uma técnica utilizada com muita frequência na determinação de chumbo e cádmio em alimentos [85]

3.2. Pré – tratamento das amostras

A etapa mais crítica em todo o processo de determinação da composição mineral de matrizes alimentares é o seu pré-tratamento.

Em alguns casos, pode ser realizada a análise direta das amostras, que consiste numa diluição simples da mesma ou o recurso a técnicas que permitem a análise de sólidos ou suspensões [2].

No entanto, a maioria das técnicas analíticas utilizadas neste tipo de análises requer a destruição da matéria orgânica, que geralmente é conseguida com recurso a digestão por via seca ou digestão por via húmida, nomeadamente a digestão assistida por micro-ondas. Apenas no seguimento das digestões se podem preparar as soluções que posteriormente serão analisadas [74].

No âmbito deste trabalho foram realizadas a digestão por via seca e a digestão assistida por micro-ondas.

3.2.1. Digestão por via seca

A digestão por via seca é o método de preparação de amostras simples e muito utilizado para a determinação de metais em alimentos [2]. Este método consiste na eliminação (calcinação) da matéria orgânica da amostra a analisar por decomposição térmica, em vaso aberto, com recurso a uma mufla. Por norma são utilizadas temperaturas entre os 450 e o 550 °C, à pressão atmosférica. As cinzas resultantes da queima são posteriormente solubilizadas num ácido apropriado [86].

Com a finalidade de prevenir a volatilização de analitos e acelerar o processo de digestão, podem ser utilizados reagentes oxidantes. São comumente utilizados para estes processos o óxido e o nitrato de magnésio, bem como o ácido nítrico.

Este tipo de tratamento de amostra pode ser aplicado a quase todo o tipo de alimentos, exceto quando se pretendem determinar metais voláteis, como o mercúrio, por exemplo. É uma técnica de fácil aplicação, que utiliza pequenas quantidades de ácido e que permite o tratamento de várias amostras em simultâneo. Uma das grandes vantagens deste método está na possibilidade de pré-concentração dos analitos na solução final, ou seja, permite digerir quantidades substanciais de amostra e dissolver a cinza resultante num pequeno volume de ácido, o que se torna bastante útil quando as concentrações dos analitos são muito baixas. Este tipo de digestão elimina por completo a matéria orgânica, o que é um pré-requisito para algumas técnicas analíticas como a voltametria, por exemplo [87].

A digestão por via seca acarreta várias desvantagens, como o facto de ser um processo demorado (dias), a possibilidade de contaminação da amostra devido ao longo período de tempo

no qual estão expostas ao ar e a possibilidade de perda de analito por volatilização. A volatilização da amostra é um fator dependente da temperatura uma vez que quanto mais alta for, maiores serão as perdas. Por outro lado, se a temperatura aplicada não for suficientemente alta, não haverá decomposição total da amostra, originando resultados incorretos [88]. A volatilização depende também da forma em que o analito está presente na amostra e do ambiente químico [89].

Este método de pré-tratamento de amostras é muito utilizado para a determinação de metais em alimentos, nomeadamente o manganês, ferro, cobre, zinco, crómio, cádmio, chumbo e níquel [90, 91].

3.2.2. Digestão por via húmida

A digestão por via húmida é um método de preparação de amostras que implica o aquecimento da amostra na presença de um ácido ou mistura de ácidos. Se durante um período de tempo o aquecimento se der a temperaturas elevadas, é possível oxidar por completo a maioria das amostras, possibilitando que na solução ácida resultante fiquem apenas os elementos a serem determinados na sua forma inorgânica mais simples [92]. A digestão por via húmida pode ser realizada através de vários métodos, nomeadamente a digestão em vaso aberto à pressão ambiente, a digestão em vaso fechado a pressão elevada e a digestão assistida por micro-ondas. Destes, a digestão por micro-ondas é o método mais atrativo e vantajoso, uma vez requer pequenos volumes de amostra e leva a poucas perdas [86].

O ácido utilizado na preparação das amostras é um fator de grande importância e pode ter consequências importantes aquando das determinações. Os ácidos utilizados na digestão por via húmida são o ácido nítrico, o ácido sulfúrico, o ácido clorídrico e o ácido perclórico e podem ser utilizados individualmente (com exceção do ácido perclórico) ou combinados uns com os outros.

O ácido nítrico é o mais adequado em todas as técnicas analíticas de espectrofotometria atómica pelo facto de não se registarem problemas analíticos severos. Normalmente o ácido é utilizado em concentrações superiores a 10 %, sendo essa concentração similar nos padrões das soluções amostra [2].

Devido à sua viscosidade, o ácido sulfúrico, é frequentemente evitado apesar de ter uma eficiência elevada em processos de digestão de matéria orgânica. Este ácido é particularmente indesejado em técnicas analíticas como a FAAS, ICP-MS e ICP-AES devido a possíveis interferências físicas, uma vez que a introdução da amostra nestas técnicas é feita por nebulização [86].

A utilização de ácido clorídrico é desaconselhável em análises de GFAAS devido à possível formação de analitos clorídricos voláteis ou de difícil dissociação, sendo geradas interferências na fase vapor e/ou espectral [2].

Apesar de ser o que apresenta maior poder de oxidação para a matéria orgânica, o ácido perclórico acarreta inúmeras desvantagens por ser extremamente reativo com a matéria orgânica, havendo o risco de explosão. Como consequência, este ácido é sempre utilizado em mistura com ácido nítrico em sistemas fechados. No entanto, devido à sua perigosidade é normalmente substituído por outro ácido [93].

O método de digestão por micro-ondas baseia-se na interação da radiação de micro-ondas com a amostra no ácido ou na mistura e ácidos, tendo como resultado o seu aquecimento e consequente decomposição.

Existem dois tipos de digestão por micro-ondas, em vaso aberto à pressão atmosférica ou em vaso fechado com sistema pressurizado. Ambas as técnicas são amplamente utilizadas para amostras orgânicas pelo facto de reduzirem a diferença entre a preparação da amostra e a sua análise através de técnicas rápidas [94]. A mais vantajosa das duas técnicas é a digestão assistida por micro-ondas em vaso fechado e sob pressão atmosférica, uma vez que é uma técnica rápida, que minimiza o consumo de ácido, o risco de contaminação e a perda de analitos voláteis [86].

O uso deste tipo de digestão é geralmente preferível relativamente ao método de aquecimento em placa, uma vez que a energia de micro-ondas é diretamente fornecida na amostra de forma eficaz e não transferida por condução como no caso das placas de aquecimento. Salientam-se também o facto da energia fornecida poder ser controlada e programada automaticamente, assegurando assim uma melhor reprodutibilidade, o facto dos tempos de digestão serem substancialmente menores e do facto de ser preciso uma menor quantidade de reagente. Adicionalmente, existe uma menor hipótese de perda de analitos por volatilização e a diminuição do risco contaminação da amostra [86, 95].

Para a dissolução de amostras alimentares os ácidos mais utilizados são o ácido nítrico e misturas de ácido nítrico e ácido clorídrico, com ou sem adição de peróxido de hidrogénio. Foram publicados vários trabalhos para a determinação de metais em alimentos em que foi utilizado como pré-tratamento de amostra a digestão por micro-ondas, por exemplo na determinação de chumbo e cádmio por GFAAS [96] e de cálcio, magnésio, sódio, e potássio por FAAS [97].

Parte II

4. Execução experimental

Neste segmento serão descritos os procedimentos experimentais dos métodos utilizados para a determinação do cálcio, zinco, potássio, sódio, chumbo e cádmio em diversos produtos alimentares por espectrofotometria de absorção atômica com chama (FAAS) e com câmara de grafite (GFAAS).

4.1. Material e equipamento utilizados

No decorrer do trabalho experimental foi utilizado o material de laboratório de uso corrente, e ainda:

- ✓ Balança analítica (capacidade de pesagem com aproximação de 0,1 mg (Sartorius BP 221 S);
- ✓ Cápsulas de porcelana;
- ✓ Vasos em *Pyrex* com capacidade de 50 mL;
- ✓ Tampas para os vasos de *Pyrex*
- ✓ Micro-barras de agitação magnéticas;
- ✓ Placa elétrica (Combiplac);
- ✓ Mufla (Barnstead Thermolyne);
- ✓ Sistema de digestão por micro-ondas com amostrador automático (CEM, modelo SP – D 80)
- ✓ Espectrofotômetro de absorção atômica com queimador de ar/acetileno equipado com lâmpada de deutério para correção de fundo e amostrador automático (Agilent Technologies 240FS AA), representado na Figura 10;
- ✓ Espectrofotômetro de absorção atômica equipado com câmara de grafite com efeito Zeeman e amostrador automático (Agilent Technologies 240Z AA), representado na Figura 11;
- ✓ Lâmpadas de cátodo oco de cálcio, zinco, potássio, sódio, cádmio e chumbo (Agilent).

É de salientar que todo o material de vidro, porcelana e sílica é lavado previamente num banho de ácido nítrico 68% (v/v) e água (1:9).



Figura 10 - Espectrofotômetro de absorção atômica com atomização por chama e amostrador automático, *Agilent*.

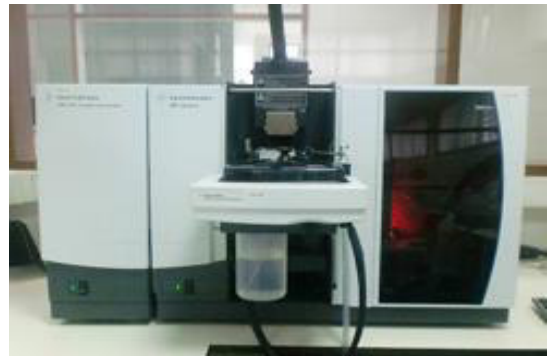


Figura 11 - Espectrofotômetro de absorção atômica com câmara de grafite e amostrador automático, *Agilent*.

4.2. Reagentes e soluções utilizados

Reagentes

- ✓ Soluções padrão de cálcio, zinco, potássio, sódio, cádmio e chumbo de 1000 mg/L, da Merck;
- ✓ Ácido clorídrico 37%, da Prolabo;
- ✓ Ácido nítrico 68%, da Prolabo ;
- ✓ Óxido de lantânio, da Sigma-Aldrich;
- ✓ Cloreto de céσιο da Prolabo .
- ✓ Ácido nítrico 67%, da Prolabo ;
- ✓ Solução de paládio 10,0 g/L, da Merck;
- ✓ Dihidrogenofosfato de amônio, da Merck.

Soluções

- ✓ Ácido clorídrico 6 mol/L
- ✓ Ácido nítrico 20 % (v/v);
- ✓ Cloreto de lantânio ($[La^{3+}] = 50 \text{ g/L}$);
- ✓ Cloreto de céσιο 100 g/L;
- ✓ Ácido nítrico 0,1 mol/L;
- ✓ Paládio 0,05 g/L (modificador de matriz do cádmio);
- ✓ Dihidrogenofosfato de amônio 5 g/L (modificador de matriz do chumbo)

Foram preparados dois brancos, o branco das amostras, preparado substituindo a amostra por água desionizada e seguindo todos os passos da preparação das amostras, e o branco dos padrões, preparado da mesma forma dos padrões, sem a adição do elemento em análise.

4.3. Amostras

Foram utilizadas as amostras indicadas na Tabela 10 ao longo do trabalho experimental.

Tabela 10 - Amostras utilizadas em FAAS e GFAAS, descrição e proveniência.

Amostras	Descrição	Proveniência
Alimentares	Bolacha, leite, produto cárnico, cevada, atum, alimento infantil, sardinha e pescada.	Clientes <i>Silliker Portugal, S.A.</i>
DPCS	<i>Infant Cereal e Biscuit</i>	<i>Silliker, USA</i>
FAPAS	<i>Soya Flour, Chilli Powder, Offal (Liver)</i>	FAPAS
BIPEA	<i>Mistelle, Red Wine, Semi-Sparkling Wine, White Wine, Wine Flavoured Drink</i>	BIPEA

No laboratório, a primeira etapa de uma análise química consiste na sua homogeneização adequada, visando os passos subsequentes.

Na homogeneização todas as amostras são trituradas/moídas num triturador GRINDOMIX, durante aproximadamente vinte segundos. As amostras, após homogeneização, são acondicionadas em frascos plásticos esterilizados, com tampa, e mantidas ao abrigo do calor, como ilustrado na Figura 12, tendo como exemplo uma amostra de batatas fritas. Posteriormente, cada analista procura o copo correspondente a análise que tem de realizar.



Figura 12 - Principais etapas de preparação da amostra: A - Triturador Grindomix; B - Colocação das batatas no copo de trituração; C - Amostra após trituração; D - Amostra homogeneizada; E - Acondicionamento da amostra em frascos de plástico

4.4. Método de determinação de cálcio, zinco, potássio e sódio numa bolacha, num leite e num produto cárnico

A determinação de cálcio, zinco, potássio e sódio numa bolacha, num leite e num produto cárnico foi efetuada segundo um procedimento interno da *Silliker Portugal, S.A.* acreditado pelo Instituto Português de Acreditação (IPAC). O procedimento em questão estabelece a metodologia para a quantificação dos teores de cálcio, cobre, ferro, magnésio, manganês, potássio, sódio e zinco por espectrofotometria de absorção atômica com chama (FAAS), após digestão da matéria orgânica por via seca, por diluição ou após a digestão da matéria orgânica por micro-ondas (no caso do cálcio, magnésio, potássio e sódio).

4.4.1. Digestão da matéria orgânica por via seca

Pesou-se rigorosamente, entre 1 a 10 g de amostra, de acordo com o teor esperado, para cápsulas de porcelana (Figura 13A) levou-se a calcinar numa placa elétrica (Figura 13B) e incinerou-se em mufla (Figura 13C), a 500 ± 15 °C, durante toda a noite. Humedeceu-se a cinza com aproximadamente 2 ml de água, secou-se em placa elétrica e levou-se novamente a mufla por um período de 2 horas. Após completa mineralização, dissolveu-se o resíduo em ácido clorídrico 6 mol/L e transferiu-se a solução para balão volumétrico de 50 ou 100 mL (Figura 13D) com porções de água desionizada, perfazendo o volume após arrefecimento da solução.

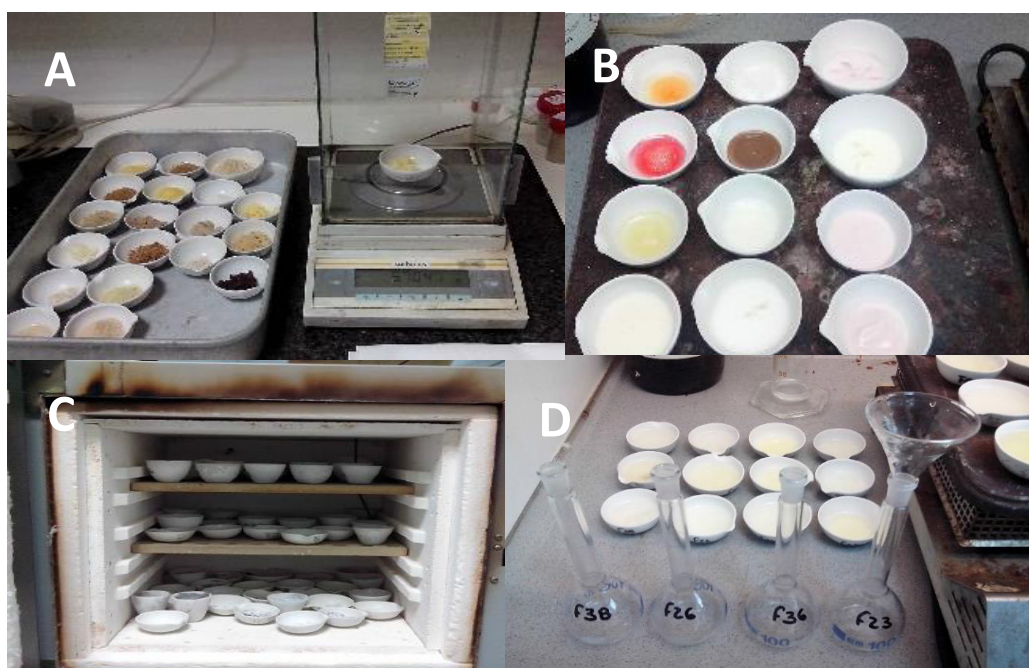


Figura 13 - Etapas da digestão da matéria orgânica por via seca: A – pesagem; B – Calcinação em placa elétrica; C – Incineração em mufla; e D – preparação das soluções das amostras.

4.4.2. Digestão da matéria orgânica por micro-ondas

Pesou-se rigorosamente 0,5 ou 1 g de amostra para vasos em *Pyrex*, consoante o tipo de amostra (seca ou com alto teor de gordura, ou húmida, respetivamente). Colocou-se uma micro-barra de agitação no interior do vaso, adicionou-se 10 mL de ácido nítrico 68 % e colocou-se tampas nos vasos. Levou-se as amostras a digerir num sistema de digestão por micro-ondas (Figura 14), utilizando o programa adequado para o tipo de amostra (Tabela 11). Transferiu-se as soluções para balões volumétricos de 50 mL e perpez-se com água.



Figura 14 - Digestor de micro-ondas da CEM com amostrador automático utilizado.

Tabela 11 - Condições de digestão das amostras: **A** - método utilizado para amostras húmidas; **B** - método utilizado para amostras secas ou com alto teor de gordura.

Método	Fase	Temperatura (°C)	Rampa de tempo (min.)	Tempo de espera (min.)	Pressão (PSI)	Potência (W)	Agitação
A	1	200	05:00	04:00	400	300	Média
	2	200	03:00	04:30	400	300	Média
B	1	150	03:30	02:00	400	300	Média
	2	200	03:00	04:30	400	300	Média

4.4.3. Soluções padrão de cálcio, zinco, potássio e sódio

Prepararam-se soluções padrão de concentração 20 mg/L para os vários elementos, a partir de padrões comerciais de 1000 mg/L. As soluções padrão utilizadas na calibração foram preparadas a partir de soluções padrão mais concentradas, adicionando cloreto de lantânio (10 mL) no caso do cálcio, ácido clorídrico 6 mol/L (5 mL) no caso do zinco e cloreto de cézio (5 mL)

e ácido clorídrico 6 mol/L (5 mL) (digestão por via seca) ou ácido nítrico 20 % (5 mL) (digestão por micro-ondas) no caso do sódio e potássio, perfazendo o volume com água. O cloreto de lantânio e o cloreto de céσιο funcionam como modificadores de matriz. Utilizaram-se as seguintes gamas de concentração: 0,1 a 5,0 mg/L para o cálcio, 0,1 a 1,0 mg/L para o zinco, 0,1 a 0,5 mg/L para o potássio e 0,1 a 1,0 mg/L para o sódio.

4.4.4. Análise das amostras e condições operatórias

Diluíram-se as soluções das amostras a analisar, de acordo com o teor de elemento esperado, e adicionou-se os modificadores de matriz (cloreto de lantânio, usado para sequestrar o fósforo, aquando da determinação cálcio e cloreto de céσιο, usado para impedir interferências de outros átomos em solução, fazendo com que esses se combinem com ele, deixando o sódio e o potássio livres de interferências) e no caso do sódio e potássio, adicionaram-se também volumes dos ácidos utilizados na preparação das amostras: ácido clorídrico 6 mol/L (digestão por via seca) e ácido nítrico 20 % (v/v) (digestão por micro-ondas). Mediu-se a absorvância das soluções padrão dos metais para construção da curva de calibração, utilizando as condições operatórias apresentadas na Tabela 12. É sempre traçada uma nova curva de calibração antes de cada análise. A absorvância das soluções amostra e dos brancos foi determinada nas mesmas condições das soluções padrão.

Tabela 12 - Condições de análise utilizadas na determinação de cálcio, zinco, potássio e sódio por FAAS.

Metal	Comprimento de onda (nm)	Corrente da lâmpada (mA)	Slit width (nm)	Gama de trabalho
Cálcio	422,7	12	0,5	0,1 a 5,0 mg/l
Zinco	213,9	10	1,0	0,1 a 1,0 mg/l
Potássio	766,5	10	1,0	0,1 a 0,5 mg/l
Sódio	589,0	10	0,5	0,1 a 1,0 mg/l

4.5. Método de determinação do cádmio e chumbo em cevada, atum, alimento infantil, sardinha e pescada

A determinação de cádmio e chumbo em cevada, atum, alimento infantil, sardinha e pescada por espectrofotometria de absorção atômica com câmara de grafite (GFAAS) foi efetuada com base na norma europeia “EN 14082:2003 [98].

4.5.1. Digestão da matéria orgânica por via seca

Pesou-se rigorosamente cerca de 10 g de amostra para cadinhos de sílica, levou-se a calcinar numa placa elétrica e incinerou-se em mufla, a 450 ± 25 °C, durante toda a noite (Figura 15). Após completa mineralização, dissolveu-se o resíduo em ácido nítrico 0,1 mol/L e transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 25 mL.

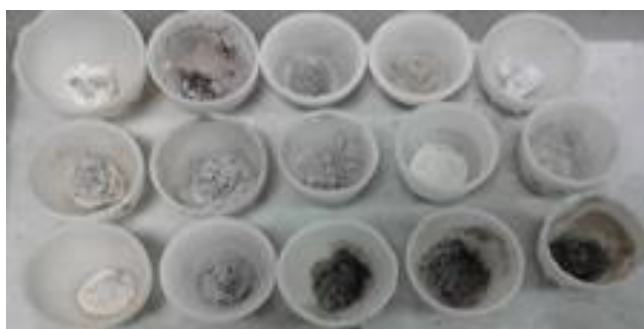


Figura 15 - Cadinhos com as cinzas das amostras obtidas após incineração na mufla.

4.5.2. Digestão da matéria orgânica por micro-ondas

Pesou-se rigorosamente 0,5 a 1 g de amostra para vasos em *Pyrex*. Colocou-se uma micro-barras de agitação no interior do vaso, adicionou-se 10 mL de ácido nítrico 68 % e colocou-se tampas nos vasos. Levou-se as amostras a digerir num sistema de digestão por micro-ondas (Figura 14), utilizando o programa adequado para amostras secas ou com alto teor de gordura. (Tabela 13). Transferiu-se as soluções para balões volumétricos de 50 mL e perpez-se com água.

Tabela 13 - Condições utilizadas para a digestão das amostras secas ou com alto teor de gordura.

Método	Fase	Temperatura (°C)	Rampa de tempo (min.)	Tempo de espera (min.)	Pressão (PSI)	Potência (W)	Agitação
B	1	150	03:30	02:00	400	300	Média
	2	200	03:00	04:30	400	300	Média

4.5.3. Soluções padrão de cádmio e chumbo

Prepararam-se soluções padrão de cádmio e chumbo a partir de padrões comerciais de 1000 mg/L. As soluções padrão utilizadas na calibração foram preparadas por diluição das soluções padrão com a solução de ácido nítrico 0,1 mol/L. Utilizou-se as seguintes gamas de concentração: 0,2 a 1,5 µg/L para o cádmio e 5,0 a 30 µg/L para o chumbo.

4.5.4. Análise das amostras e condições operatórias

Determinou-se a absorvância das soluções de calibração para construção das curvas de calibração, utilizando as condições operatórias descritas na Tabela 14 e as condições de operação da câmara de grafite apresentadas nas tabelas 15 e 16, sendo sempre traçada uma nova curva de calibração antes de cada análise. Mediu-se a absorvância das soluções amostra e dos brancos nas mesmas condições das soluções padrão.

Tabela 14 – Condições de análise utilizadas na determinação de cádmio e chumbo por GFAAS.

Condições operatórias	Cádmio	Chumbo
Comprimento de onda	228,8 nm	283,3 nm
Slit width	0,5 nm	0,5 nm
Volume de amostra	20 µL	20 µL
Volume do modificador de matriz	5 µL (paládio)	5 µL (dihidrogenofosfato de amónio)
Corrente da lâmpada	8,0 mA	12,0 mA
Gás	Árgon	Árgon
Gama de trabalho	0,2 a 1,5 µg/L	5,0 a 30 µg/L

O paládio e o dihidrogenofosfato de amónio, como modificadores de matriz, servem para remover as interferências que podem ocorrer antes da fase de atomização e estabilizar o analito para temperaturas elevadas.

Tabela 15 - Programação dos tempos e temperaturas da câmara de grafite para a determinação do cádmio.

Etapas	Temperatura (°C)	Tempo (s)	Fluxo (L/min)
1	85	5,0	0,3
2	95	40,0	0,3
3	120	10,0	0,3
4	250	5,0	0,3
5	250	1,0	0,3
6	250	2,0	0
7	1800	0,8	0
8	1800	2,0	0
9	1800	2,0	0,3

Tabela 16 - Programação dos tempos e temperaturas da câmara de grafite para a determinação do chumbo.

Etapas	Temperatura (°C)	Tempo (s)	Fluxo (L/min)
1	85	5,0	0,3
2	95	80,0	0,3
3	120	10,0	0,3
4	400	5,0	0,3
5	400	2,1	0,3
6	400	2,1	0
7	2100	0,9	0
8	2100	2,0	0
9	2100	2,0	0,3

4.6. Determinação do sódio em vinhos e validação do método

A determinação do sódio em vinhos foi determinada por espectrofotometria de absorção atômica e realizada com base num protocolo interno estabelecido pela empresa, com base no protocolo estabelecido para a determinação do sódio em produtos agroalimentares. A metodologia para a validação deste método consistiu na análise de amostras BIPEIA provenientes de ensaios de comparação interlaboratorial analisadas pelo laboratório de forma a estimar todos os parâmetros de validação.

4.6.1. Soluções padrão de sódio

Prepararam-se soluções padrão de concentração 20 mg/L para o sódio a partir do padrão comercial de 1000 mg/L. As soluções padrão utilizadas na calibração foram preparadas por diluição das soluções mãe, ou de soluções padrão mais concentradas, com água e adicionando cloreto de cézio e ácido clorídrico 6 mol/L (digestão por via seca). Utilizou-se a gama de concentração de 0,1 a 1,0 mg/L para o sódio.

4.6.2. Análise das amostras e condições operatórias

Para as matrizes de vinho, não é necessária preparação da amostra. Foi transferido 1 mL da amostra para um balão volumétrico de 10 mL, adicionou-se 1 mL o cloreto de cézio (modificador de matriz) e também 1 mL de ácido clorídrico 6 mol/L e perpez-se o volume com água. Determinou-se a absorvância das soluções de calibração para construção da curva de calibração, utilizando as condições operatórias apresentadas na Tabela 12. É sempre traçada uma nova curva de calibração antes de cada análise. A absorvância das soluções amostra e dos brancos foi medida nas mesmas condições das soluções padrão.

5. Resultados e discussão

Neste segmento serão apresentados e discutidos os resultados obtidos por cada um dos métodos descritos no capítulo anterior, bem como aplicadas ferramentas de controlo para validar esses mesmos resultados. Será avaliado o método e o desempenho do analista na determinação de cálcio, zinco, potássio e sódio por FAAS por meio de digestão por via seca. Será feito um estudo de comparação entre a digestão de matéria orgânica por via seca com a digestão da matéria orgânica por micro-ondas na determinação do cádmio e do chumbo, recorrendo em ambos os casos a amostras utilizadas em circuitos interlaboratoriais. Uma vez que o método de determinação do sódio na matriz vinhos ainda não se encontrava validada, também será apresentada a parte da validação dessa extensão.

5.1. Determinação do cálcio, zinco, potássio e sódio numa bolacha, num leite e num produto cárnico, após digestão da matéria orgânica por via seca

Os teores de cálcio, zinco, potássio e sódio em produtos alimentares foram determinados por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS). Foram analisadas amostras de rotina laboratorial, nomeadamente uma bolacha, um leite e um produto cárnico. Estas amostras foram sujeitas a digestão da matéria orgânica por via seca.

5.1.1. Curvas de calibração

Construiu-se uma curva de calibração para cada um dos elementos a determinar (Tabela 17). No caso do cálcio, para além da curva traçada com todos os pontos (0,1 a 5,0 mg/L), traçou-se também uma curva de calibração de gama baixa de concentrações (0,1 a 1,0 mg/L) de forma a obter um melhor ajuste para concentrações inferiores a 1,0 mg/L. É de salientar que todas as curvas de calibração apresentam bons coeficientes de correlação ($r > 0,999$).

Tabela 17 – Parâmetros das retas de calibração efetuadas para a determinação de cada um dos elementos pelo método de FAAS com digestão da matéria orgânica por via seca.

Analista	Elemento	Equação da reta de calibração*
Meu	Cálcio	$y = (0,344_0 \pm 0,003_5)x + (0,052_1 \pm 0,008_6)$
	Cálcio (gama baixa)	$y = (0,363_4 \pm 0,005_8)x + (0,041_8 \pm 0,002_4)$
	Zinco	$y = (0,243_9 \pm 0,004_3)x + (0,006_1 \pm 0,002_4)$
	Potássio	$y = (0,397_2 \pm 0,009_6)x + (0,017_6 \pm 0,002_4)$
	Sódio	$y = (0,369_0 \pm 0,006_4)x + (0,014_7 \pm 0,004_2)$

Laboratório 1	Cálcio	$y = (0,352_4 \pm 0,005_8)x + (0,057_9 \pm 0,01_4)$
	Cálcio (gama baixa)	$y = (0,383_0 \pm 0,01_8)x + (0,041_8 \pm 0,007_5)$
	Zinco	$y = (0,243_0 \pm 0,007_0)x + (0,009_3 \pm 0,003_8)$
	Potássio	$y = (0,308_9 \pm 0,009_5)x + (0,018_6 \pm 0,002_4)$
	Sódio	$y = (0,369_6 \pm 0,007_3)x + (0,016_7 \pm 0,004_8)$
Laboratório 2	Cálcio	$y = (0,337_1 \pm 0,004_7)x + (0,057_6 \pm 0,01_2)$
	Cálcio (gama baixa)	$y = (0,369_2 \pm 0,01_2)x + (0,042_0 \pm 0,005_0)$
	Zinco	$y = (0,248_7 \pm 0,005_4)x + (0,003_9 \pm 0,002_9)$
	Potássio	$y = (0,309_0 \pm 0,009_8)x + (0,021_0 \pm 0,002_4)$
	Sódio	$y = (0,373_2 \pm 0,009_4)x + (0,017_8 \pm 0,006_1)$

*Incertezas calculadas para uma probabilidade de 95%

De forma a avaliar a qualidade das curvas de calibração que se obtiveram, as mesmas foram comparadas com curvas de calibração efetuadas anteriormente pelo laboratório de Métodos Instrumentais de Análise.

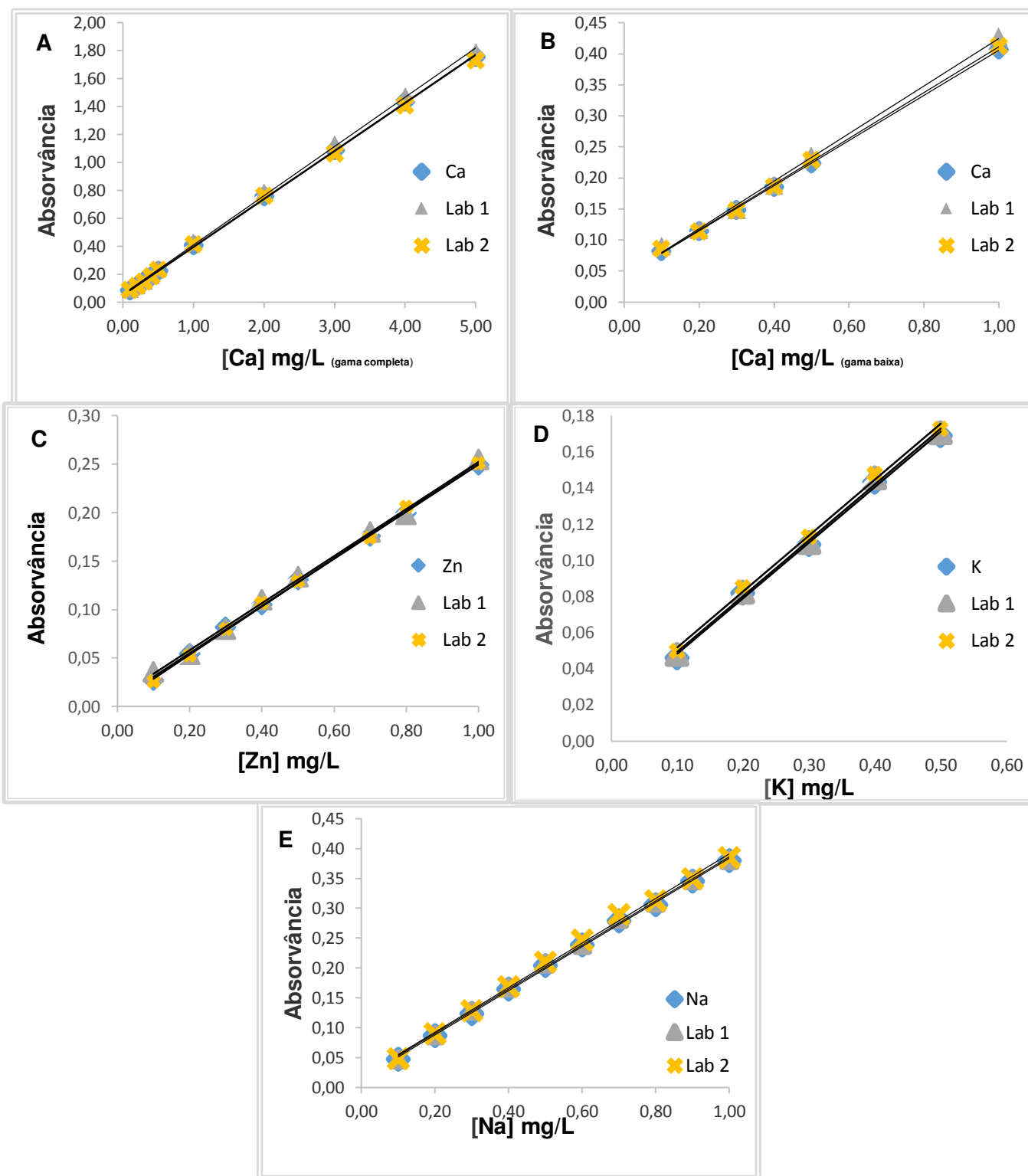


Figura 16 - Comparação entre as curvas de calibração obtidas para o cálcio (**A**- gama completa e **B**- gama baixa), zinco (**C**), potássio (**D**) e sódio (**E**) com as curvas de calibração efetuadas em análises de rotina no laboratório (Lab 1 e Lab 2).

Por observação das curvas dos quatro elementos estudados, pode concluir-se que bastante semelhantes às curvas efetuadas anteriormente pelo laboratório em análises de rotina, a nível de declive, ordenada na origem e coeficiente de correlação.

A partir das equações 1 e 2, respetivamente, e aplicando a fórmula de cálculo dos teores dos elementos nas amostras (3), foram determinados os limiares analíticos, limite de deteção (LD), intervalo em que é possível distinguir, com uma dada confiança estatística, o sinal do branco do sinal da amostra e assim indicar a presença ou ausência do analito, e limite de quantificação (LQ) menor concentração medida a partir da qual é possível a quantificação do analito com uma determinada precisão e exatidão ^[115].

$$(1) \quad LD = \frac{3,3 S_{y/x}}{\text{declive}}$$

$$(2) \quad LQ = \frac{10 S_{y/x}}{\text{declive}}$$

$$(3) \quad C = \frac{c_i \times v_i \times R}{m_i}$$

- ✓ $S_{y/x}$ - desvio padrão residual da curva de calibração;
- ✓ C – teor de cada elemento, expresso em mg/kg ou mg/L;
- ✓ c_i – concentração do elemento obtida por interpolação na curva de calibração em mg/L;
- ✓ v_i - volume da solução da amostra em mL;
- ✓ m_i - massa ou volume da amostra em g ou mL;
- ✓ R – razão de volumes.

No Anexo A está representado um exemplo de cálculo dos limiares analíticos. Sempre que se traça uma nova reta, é determinado o limite de quantificação e este, controlado numa carta de controlo. O valor do limite de quantificação utilizado pelo laboratório foi definido por defeito a partir do valor obtido utilizando o padrão de quantificação, que nestes casos é o padrão de menor concentração. Na Tabela 18 são apresentados os limites de deteção e de quantificação determinados para cada um dos elementos estudados, bem como os limites de quantificação definidos pelo laboratório.

Tabela 18 - Limiares analíticos calculados a partir das curvas de calibração e LQ definidos pelo laboratório para a determinação do cálcio, zinco, potássio e sódio pelo método de FAAS com digestão da matéria orgânica por via seca.

Elemento	LD_{calculado} (mg/kg)	LQ_{calculado} (mg/kg)	LQ_{laboratório} (mg/kg)
Cálcio (gama baixa)	0,2171	0,6579	1,0
Zinco	0,3219	0,9754	1,0
Potássio	0,3278	0,9932	1,0
Sódio	0,3657	1,1082	1,0

Os limiares analíticos para o cálcio foram calculados a partir da curva de calibração da gama baixa, uma vez que a concentração das amostras com absorvância inferior ao padrão de 1,0 mg/L são calculadas a partir dessa curva. Como se verifica, à exceção do sódio, os limites de quantificação determinados para as curvas de calibração dos elementos em estudo são inferiores aos limites de quantificação definidos pelo laboratório, o que é benéfico e suporta os limites estabelecidos pelo laboratório. Para o limite de quantificação do sódio, os resultados não foram os esperados, sendo o $LQ_{\text{calculado}} > LQ_{\text{laboratório}}$, desta forma, o laboratório deve redefinir o LQ a apresentar ao cliente para este elemento.

O critério de aceitação dos brancos é definido pelo laboratório e define que a absorvância do branco seja inferior a 1/3 da absorvância do padrão de quantificação, que no que respeita aos elementos analisados corresponde ao padrão de menor concentração da curva de calibração (0,1 mg/L em todos os elementos). Como isto se verifica, o seu valor pode ser desprezado e sendo assim não contabilizado no cálculo das concentrações nas amostras.

No início de cada análise e forma a validar as curvas de calibração, foram avaliados o padrão de menor concentração e o de maior concentração, o primeiro por se encontrar na zona de concentrações mais baixa, aquela que é mais suscetível à ocorrência de desvios e o segundo para verificar se a curva se mantém válida para concentrações mais elevadas. De forma a verificar se a curva de calibração se manteve válida durante toda a análise a cada 5 a 10 amostras foi analisado um padrão de controlo. Assim, são considerados válidos os padrões de controlo cujo erro relativo seja igual ou inferior a 15%, percentagem de erro máxima definida pelo laboratório. Na Tabela 19 estão representados os erros relativos obtidos na análise dos padrões de controlo utilizados.

Tabela 19 - Erro relativo para a análise dos padrões de controlo do cálcio, zinco, potássio e sódio pelo método de FAAS com digestão da matéria orgânica por via seca.

Elemento	Concentração de referência (mg/L)	Concentração obtida (mg/L)	Erro relativo (%)	Classificação
Cálcio	0,1000	0,08600	14,0	Aceitável
	1,000	1,03	3,4	Aceitável
	2,000	1,961	2,0	Aceitável
	5,000	4,960	0,8	Aceitável
Cálcio (gama baixa)	0,1000	0,110	9,6	Aceitável
	1,000	1,01	0,6	Aceitável
Zinco	0,1000	0,0950	5,0	Aceitável
	0,9000	0,888	1,3	Aceitável
	1,000	0,964	3,6	Aceitável
Potássio	0,1000	0,0990	1,0	Aceitável

	0,4000	0,390	2,5	Aceitável
	0,5000	0,500	0,0	Aceitável
Sódio	0,1000	0,0870	13,0	Aceitável
	0,5000	0,498	0,4	Aceitável
	1,000	0,956	4,4	Aceitável

Por observação da Tabela 19, pode dizer-se que todos os padrões de controlo estão classificados como aceitáveis, apresentando erros relativos máximos de 14,0% no caso do cálcio, de 5,0% no caso do zinco, 2,5% no caso do potássio e 13% no caso do sódio. No entanto, é de frisar que a não-aceitação dos padrões de concentração inferior a 1,0 mg/L na curva de gama maior, pode ser admitida desde que os mesmos estejam aceitáveis na curva de gama baixa. A aceitação de todos os padrões de controlo demonstra que as curvas de calibração se mantiveram válidas para todas as análises.

5.1.2. Resultados obtidos nas análises das amostras

Determinou-se o teor de cálcio, zinco, potássio e sódio em três matrizes distintas de alimentos, nomeadamente uma bolacha, um leite e uma carne.

Em cada série de trabalho foi analisada uma amostra diária de controlo (DPCS) do cálcio, zinco, potássio e sódio, farinha láctea (*Infant Cereal*), em duplicado. Os resultados encontram-se na Tabela 20.

O DPCS, *Daily Process Control Sample*, trata-se de um material de referência que é analisado para a validação da série de trabalho. As amostras de controlo de processo seguem o mesmo tratamento que as amostras que são analisadas rotineiramente. O resultado obtido para as amostras de controlo terá de estar dentro dos limites de uma carta de controlo validada por vinte pontos experimentais. Caso não se verifique que o resultado se encontra dentro do intervalo estabelecido, todos os resultados da série de trabalho perdem a sua validade e todas as amostras terão de ser reprocessadas. O intervalo da carta de controlo está estabelecido informaticamente e os seus resultados foram validados por uma série de laboratórios que provaram os teores contidos na amostra de controlo de processo. O DPCS tem de ser renovado periodicamente, consoante a extensão da sua validade. No processo de transição de DPCS, aquele que valida as amostras é o mais antigo. Simultaneamente e paralelamente, o novo DPCS é analisado para proceder à construção de uma nova carta de controlo que assume um carácter provisório ao fim de sete pontos experimentais, altura onde se rejeita o DPCS antigo. Quando são atingidos os vinte pontos a carta de controlo é refeita e passa a ter carácter definitivo, sendo que não são admissíveis resultados abaixo ou acima dos seus limites.

É recomendado o recurso a duplicados entre 5 a 10 % do total de análises. A sua escolha é aleatória e da responsabilidade do analista. O uso de duplicados é recomendado para análises com vários passos e fontes de erro, assim como para novas amostras ou amostras de difícil homogeneização e/ou estabilidade [99]. Após a homogeneização da amostra, são repetidas duas tomas da mesma e estas tratadas e analisadas individualmente passando por todo o processo até a determinação dos teores dos seus componentes. A diferença dos resultados não deve ser maior do que a estipulada por cada método (precisão intermédia). É de frisar que o recurso a análise de amostras em duplicado (ou triplicado, ou outro número de réplicas) não garante, por si só, que o resultado final seja exato [99].

Tabela 20 - Avaliação do desempenho do método - Valores obtidos para o padrão diário de controlo (DPC) do cálcio, zinco, potássio e sódio pelo método de FAAS com digestão da matéria orgânica por via seca.

DPCS	Valor obtido (mg/kg)	Limite inferior (mg/kg)	Limite superior (mg/kg)	Desempenho
<i>Infant Cereal (Ca)</i>	$(4,0_1 \pm 0,5_8) \times 10^3$	$3,8_5 \times 10^3$	$4,4_6 \times 10^3$	Aceitável
	$(8,1_5 \pm 0,6_0) \times 10^3$			Não aceitável
<i>Infant Cereal (Zn)</i>	$(2,6_2 \pm 0,1_1) \times 10^1$	$2,4_0 \times 10^1$	$2,8_3 \times 10^1$	Aceitável
	$(2,4_4 \pm 0,5_6) \times 10^1$			Aceitável
<i>Infant Cereal (K)</i>	$(7,5_9 \pm 0,7_7) \times 10^3$	$6,5_9 \times 10^3$	$7,7_7 \times 10^3$	Aceitável
	$(7,5_1 \pm 0,7_9) \times 10^3$			Aceitável
<i>Infant Cereal (Na)</i>	$(1,1_5 \pm 0,4_6) \times 10^3$	$1,0_1 \times 10^3$	$1,2_7 \times 10^3$	Aceitável
	$(1,1_4 \pm 0,4_6) \times 10^3$			Aceitável

Com exceção de um dos duplicados do Ca, todos os ensaios apresentam valores aceitáveis de desempenho, o que significa que os seus valores se encontram dentro dos limites definidos por uma carta de controlo construída para cada elemento pelo laboratório.

Foi realizado um ensaio em duplicado para a amostra da bolacha, para cada um dos elementos, para avaliar a precisão dos resultados e detetar possíveis erros aleatórios. O critério de aceitação dos duplicados, estabelecido pelo laboratório, diz que estes são aceites se o desvio relativo entre eles for igual ou inferior a 10%. Na Tabela 21 estão representados os resultados das análises dos duplicados realizados e a respetiva aceitação.

Tabela 21 - Desvio relativo do duplicado efetuado para a determinação do cálcio, zinco, potássio e sódio pelo método de FAAS com digestão da matéria orgânica por via seca.

Amostra	Valor obtido (mg/kg)	Média	Desvio relativo (%)	Classificação
Bolacha (Ca)	$(2,6_3 \pm 0,7_3) \times 10^3$	$2,5_4 \times 10^3$	6,7	Aceitável
	$(2,4_6 \pm 0,6_7) \times 10^3$			
Bolacha (Zn)	$(0,6_8 \pm 0,04_3) \times 10^1$	$0,6_7 \times 10^1$	3,0	Aceitável
	$(0,6_6 \pm 0,03_8) \times 10^1$			
Bolacha (K)	$(2,0_4 \pm 0,2_3) \times 10^3$	$2,0_0 \times 10^3$	3,2	Aceitável
	$(1,9_7 \pm 0,2_2) \times 10^3$			
Bolacha (Na)	$(2,8_9 \pm 0,1_2) \times 10^3$	$2,9_2 \times 10^3$	2.1	Aceitável
	$(2,9_5 \pm 0,1_2) \times 10^3$			

Os resultados para o duplicado, como se pode observar na Tabela 21, estão aceitáveis tendo um desvio relativo entre 2,1 e 6,7%, concluindo-se que os resultados apresentam boa precisão.

5.1.3. Cálcio

Na Tabela 22, estão apresentados os teores de cálcio obtidos para os alimentos selecionados em g/100g por ser esta a unidade mais utilizada na rotulagem dos alimentos. É também apresentado o valor diário de referência (VDR) de ingestão de cálcio por um adulto, 1,0 g^[100].

Tabela 22 - Teores de cálcio determinados pelo método de FAAS com digestão da matéria orgânica por via seca nos alimentos selecionados e respetiva % do valor diário de referência (VDR).

Amostra	Teor de cálcio (g/100g)	VDR %
Bolacha	$(2,6_3 \pm 0,7_3) \times 10^{-2}$	26%
	$(2,4_6 \pm 0,6_7) \times 10^{-2}$	25%
Leite	$(1,1_7 \pm 0,3_7) \times 10^{-2}$	12%
Produto cárnico	$(88,4 \pm 0,06_5) \times 10^{-3}$	0,88%

Relativamente ao teor de cálcio nestes alimentos, pode observar-se que os seus teores estão bastante diferenciados, uma vez que para a bolacha os teores deste mineral ($(2,6_3 \pm 0,7_3) \times 10^{-2}$ g/100g e $(2,4_6 \pm 0,6_7) \times 10^{-2}$ g/100g) são substancialmente superiores aos encontrados num produto cárnico ($(88,4 \pm 0,06_5) \times 10^{-3}$ g/100g), por exemplo. Observa-se que o teor de cálcio

varia significativamente de amostra para amostra, tal pode ser explicado pela diferença na matriz de cada amostra.

5.1.4. Zinco

Na Tabela 23, estão apresentados os teores de zinco obtidos para os alimentos selecionados em g/100g por ser esta a unidade mais utilizada na rotulagem dos alimentos. É também apresentado o valor diário de referência (VDR) de ingestão de zinco por um adulto, 0,011 g ^[101].

Tabela 23 - Teores de zinco determinados pelo método de FAAS com digestão da matéria orgânica por via seca nos alimentos selecionados e respetiva % do valor diário de referência (VDR).

Amostra	Teor de zinco (g/100g)	VDR %
Bolacha	$(0,6_8 \pm 0,04_3) \times 10^{-3}$	6%
	$(0,6_6 \pm 0,03_8) \times 10^{-3}$	6%
Leite	$(0,4_1 \pm 0,04_1) \times 10^{-3}$	4%
Produto cárnico	$(3,3_3 \pm 0,2_1) \times 10^{-2}$	30%

Através da análise da tabela anterior, pode dizer-se que relativamente ao teor de zinco determinado nestes alimentos, todos eles têm valores bastante reduzidos. No entanto, devido à pequena quantidade de zinco necessária no dia-a-dia, os valores de percentagem diária recomendados são consideráveis, chegando mesmo aos 30% no caso do produto cárnico. Observa-se que o teor de zinco não varia significativamente quando são comparados os valores da bolacha com o do leite, no entanto verifica-se que o produto cárnico apresenta valores muito diferentes das restantes amostras, tal pode ser explicado pela diferença na matriz de cada amostra e pelo facto de serem produtos processados (bolacha e produto cárnico).

5.1.5. Potássio

Na Tabela 24, estão apresentados os teores de potássio obtidos para os alimentos selecionados em g/100g por ser esta a unidade mais utilizada na rotulagem dos alimentos. É também apresentado o valor diário de referência (VDR) de ingestão de potássio por um adulto, 3,51 g ^[102].

Tabela 24 - Teores de potássio determinados pelo método de FAAS com digestão da matéria orgânica por via seca nos alimentos selecionados e respetiva % do valor diário de referência (VDR).

Amostra	Teor de potássio (g/100g)	VDR %
Bolacha	$(2,0_4 \pm 0,2_3) \times 10^{-1}$	6,0%
	$(1,9_7 \pm 0,2_2) \times 10^{-1}$	6,0%
Leite	$(1,3_5 \pm 0,1_1) \times 10^{-1}$	4,0%
Produto cárnico	$(4,8_0 \pm 0,7_3) \times 10^{-1}$	14%

Ao serem analisados os teores de potássio nos alimentos selecionados, pode dizer-se que à semelhança do que acontece com o zinco, os valores são baixos, notando-se uma maior quantidade deste elemento no produto cárnico ($(4,8_0 \pm 0,7_3) \times 10^{-1}$ g/100g) e uma menor no leite ($(1,3_5 \pm 0,1_1) \times 10^{-1}$ g/100g). Observa-se que o teor de potássio não varia significativamente quando são comparados os valores da bolacha com o do leite, no entanto verifica-se que o produto cárnico apresenta quase o dobro dos valores das restantes amostras, tal pode ser explicado pela diferença na matriz de cada amostra e pelo facto de serem produtos processados (bolacha e produto cárnico).

5.1.6. Sódio

Na Tabela 25, estão apresentados os teores de sódio obtidos para os alimentos selecionados em g/100g por ser esta a unidade mais utilizada na rotulagem dos alimentos. É também apresentado o valor diário de referência (VDR) de ingestão de sódio por um adulto, 2,0 g^[103].

Tabela 25 - Teores de sódio determinados pelo método de FAAS com digestão da matéria orgânica por via seca nos alimentos selecionados e respetiva % do valor diário de referência (VDR).

Amostra	Teor de sódio (g/100g)	VDR %
Bolacha	$(2,8_9 \pm 0,1_2) \times 10^{-1}$	14%
	$(2,9_5 \pm 0,1_2) \times 10^{-1}$	15%
Leite	$(0,31_0 \pm 0,01_4) \times 10^{-2}$	2,0%
Produto cárnico	$1,4_9 \pm 0,08_5 \times 10^0$	75%

Relativamente ao teor de sódio nestes alimentos, pode observar-se na tabela acima que os seus teores estão bastante diferenciados, sendo que o leite tem o menor teor de sódio ($(0,31_0$

$\pm 0,01_4$) $\times 10^{-2}$ g/100g), a bolacha um teor superior ($(2,8_9 \pm 0,1_2) \times 10^{-1}$ e $(2,9_5 \pm 0,1_2) \times 10^{-1}$ g/100g) e o produto cárnico um teor muito superior aos restantes ($1,4_9 \times 10^4$ mg/kg). Observa-se que o teor de sódio varia significativamente de amostra para amostra, tal pode ser explicado pela diferença na matriz de cada amostra e também pelo facto de a bolacha e do produto cárnico serem produtos processados e lhes ser adicionado sal (junção de especiarias, farinhas, entre outros...). Pode dizer-se que a necessidade de ingestão de sódio é largamente coberta pela alimentação e que se consome mais sódio do que o desejável. Deve ter-se preferência por alimentos naturais em detrimento dos processados.

5.1.7. Determinação do sódio numa bolacha, num leite e num produto cárnico após digestão por micro-ondas

Procedeu-se à análise das amostras escolhidas, bolacha, leite e produto cárnico, pelo método de digestão da matéria orgânica por micro-ondas. A equação da reta de calibração obtida para o sódio está representada na Tabela 26.

Tabela 26 - Parâmetros da reta de calibração do sódio, efetuadas por FAAS com digestão da matéria orgânica por micro-ondas.

Método	Equação da reta de calibração
Digestão por micro-ondas	$y = (0,431_8 \pm 0,006_1)x + (0,005_2 \pm 0,004_0)$

A curva de calibração apresentou bons coeficientes de correlação ($r > 0,999$).

Na Tabela 27 estão representados os limites de deteção e de quantificação determinados para o sódio, bem como os limites de quantificação definidos pelo laboratório.

Tabela 27 - Limiares analíticos determinados e limites de quantificação definidos pelo laboratório para a determinação de sódio pelos métodos FAAS com digestão da matéria orgânica por micro-ondas.

Método	LD _{calculado} (mg/kg)	LQ _{calculado} (mg/kg)	LQ _{laboratório} (mg/kg)
Digestão por micro-ondas	0,3015	0,9135	1,0

O limite de quantificação calculado nesta análise é inferior ao definido pelo laboratório, o que é favorável e suporta os valores definidos pelo laboratório. Para validar a curva de calibração analisou-se a solução padrão de menor concentração e a de maior concentração no início da análise e padrões de controlo a cada 5 a 10 amostras. Na Tabela 28 está apresentado o erro relativo obtido para a análise dos padrões de controlo utilizados por este método de digestão, sendo que o erro máximo estipulado pelo laboratório é de 15%.

Tabela 28 - Erro relativo para a análise dos padrões de controlo do sódio pelo método FAAS com digestão da matéria orgânica por micro-ondas (erro máximo aceitável - 15 %).

Método	Concentração de referência (mg/L)	Concentração obtida (mg/L)	Erro relativo (%)	Classificação
Digestão por micro-ondas	0,1000	0,105	0,5	Aceitável
	0,5000	0,546	9,2	Aceitável
	1,000	1,03	2,6	Aceitável

Por observação da Tabela 28, pode dizer-se que todos os padrões de controlo estão classificados como aceitáveis, apresentando erros relativos máximos de 9,2%. A aceitação de todos os padrões de controlo demonstra que as curvas de calibração se mantiveram válidas para todas as análises.

Foram também analisadas as amostras selecionadas (bolacha, leite e carne), pelo método de FAAS com digestão da amostra por micro-ondas. Os resultados obtidos para esta amostra estão apresentados na Tabela 29.

Tabela 29 - Resultados obtidos para a determinação de sódio na bolacha em duplicado pelo método FAAS com digestão da matéria orgânica por micro-ondas.

Método	Amostra	Concentração obtida (mg/kg)	Média dos duplicados (mg/kg)	Desvio relativo dos duplicados (%)
Digestão por micro-ondas	Bolacha	$(3,0_6 \pm 0,1_1) \times 10^3$ $(3,0_5 \pm 0,1_1) \times 10^3$	$3,0_6 \times 10^3$	0,5

O duplicado realizado apresentou desvios relativos baixos, 0,5 %. Os resultados apresentam boa precisão.

Na Tabela 30 estão representados os teores de sódio obtidos para os alimentos selecionados em g/100g por ser esta a unidade mais utilizada na rotulagem dos alimentos. É também apresentado o valor diário de referência (VDR) para um adulto, 2,0 g ^[103].

Tabela 30 - Teores de sódio determinados pelo método de FAAS com digestão da matéria orgânica por micro-ondas nos alimentos selecionados e respetiva % do valor diário de referência (VDR).

Amostra	Teor de sódio (g/100g)	VDR %
Bolacha	$(3,0_6 \pm 0,1_1) \times 10^{-1}$	15%
	$(3,0_5 \pm 0,1_1) \times 10^{-1}$	15%
Leite	$(0,40_2 \pm 0,01_5) \times 10^{-2}$	2,0%
Produto cárnico	$(1,6_8 \pm 0,05_8) \times 10^0$	84%

Verifica-se que os valores obtidos pelos dois métodos, considerando as incertezas associadas, sobrepõem-se, o que demonstra que ambos os métodos permitem obter valores equivalentes.

5.1.8. Comparação dos resultados obtidos na determinação do sódio por FAAS, pelos dois métodos de digestão da matéria orgânica (via seca e micro-ondas)

✓ Curvas de calibração:

Tabela 31 - Parâmetros das retas de calibração efetuadas para a análise do sódio por FAAS, pelos dois métodos de digestão da matéria orgânica, via seca e micro-ondas.

Método	Equação da reta de calibração
Digestão por via seca	$y = (0,369_0 \pm 0,006_4)x + (0,014_7 \pm 0,004_2)$
Digestão por micro-ondas	$y = (0,431_8 \pm 0,006_1)x + (0,005_2 \pm 0,004_0)$

As curvas de calibração são semelhantes a nível de declive, ordenada na origem e apresentam bons coeficientes de correlação ($r > 0,999$).

✓ Limiars analíticos:

Tabela 32 - Limiars analíticos determinados e limites de quantificação definidos pelo laboratório para a determinação do sódio por FAAS, pelos dois métodos de digestão da matéria orgânica, via seca e micro-ondas.

Método	LD _{calculado} (mg/kg)	LQ _{calculado} (mg/kg)	LQ _{laboratório} (mg/kg)
Digestão por via seca	0,3657	1,1082	1,0
Digestão por micro-ondas	0,3015	0,9135	1,0

Para o limite de quantificação da análise recorrendo à digestão por via seca, os resultados não foram os esperados, sendo o $LQ_{calculado} > LQ_{laboratório}$, desta forma, o laboratório deve redefinir o LQ a apresentar ao cliente. O limite de quantificação da análise recorrendo à digestão por micro-ondas deu um valor inferior ao definido pelo laboratório, o que é favorável e suporta os limites definidos pelo laboratório.

✓ Resultados obtidos para as amostras:

Tabela 33 - Resultados das amostras na determinação do sódio por FAAS pelos dois métodos de digestão da matéria orgânica, via seca e micro-ondas.

Método	Amostra	Teor de sódio (g/100g)	VDR %
Digestão por via seca	Bolacha	$(2,8_9 \pm 0,1_2) \times 10^{-1}$	14%
		$2,9_5 \pm 0,1_2) \times 10^{-1}$	15%
	Leite	$(0,31_0 \pm 0,01_4) \times 10^{-2}$	2,0%
	Produto cárnico	$(1,4_9 \pm 0,08_5) \times 10^0$	75%
Digestão por micro- ondas	Bolacha	$(3,0_6 \pm 0,1_1) \times 10^{-1}$	15%
		$(3,0_5 \pm 0,1_1) \times 10^{-1}$	15%
	Leite	$(0,40_2 \pm 0,01_5) \times 10^{-2}$	2,0%
	Produto cárnico	$(1,6_8 \pm 0,05_8) \times 10^0$	84%

Comparando os dois métodos de digestão, pode dizer-se que os resultados obtidos são bastante semelhantes.

5.2. Determinação de cádmio e de chumbo em cevada, atum, alimento infantil, sardinha e pescada

Os teores de cádmio e de chumbo foram determinados por espectroscopia de absorção atômica com câmara de grafite. Foram realizados ensaios com amostras normalmente analisadas em rotina (cevada, atum, alimento infantil, sardinha e pescada) e em amostras utilizadas em circuitos interlaboratoriais, para avaliar o desempenho do método, bem como do analista na determinação do chumbo e do cádmio.

5.2.1. Curvas de calibração

Construíram-se curvas de calibração para cada um dos elementos a determinar, atendendo ao processo de digestão da amostra, via seca e micro-ondas, respetivamente. Nas Tabelas 34 e 35 estão representados os resultados. Os elementos, apresentam bons coeficientes de correlação ($r > 0,999$), pelas duas formas de digestão da amostra.

Tabela 34 - Parâmetros das retas de calibração efetuadas para a análise do cádmio e do chumbo por GFAAS, com digestão da matéria orgânica por via seca.

Elemento	Equação da reta de calibração*
Cádmio	$y = (0,0482 \pm 0,0009)x + (-0,0005 \pm 0,0006)$
Chumbo	$y = (0,00298 \pm 0,00004)x + (0,0007 \pm 0,0005)$

* Incertezas calculadas para uma probabilidade de 95%

Tabela 35 - Parâmetros das retas de calibração efetuadas para a análise do cádmio e do chumbo por GFAAS, com digestão da matéria orgânica por micro-ondas.

Elemento	Equação da reta de calibração*
Cádmio	$y = (0,0734 \pm 0,001_3)x + (0,0031 \pm 0,0009)$
Chumbo	$y = (0,00381 \pm 0,00005)x + (-0,0021 \pm 0,0008)$

A partir das equações 1 e 2, respetivamente, e aplicando a fórmula de cálculo dos teores dos elementos nas amostras (7), foram determinados os limiares analíticos, limite de deteção (LD) e limite de quantificação (LQ).

$$(7) \quad C = \frac{c_i \times v_i \times R}{m_i \times 1000}$$

- ✓ C – teor de cada elemento, expresso em mg/kg ou mg/L;

- ✓ c_i – concentração do elemento obtida por interpolação na curva de calibração em $\mu\text{g/L}$;
- ✓ v_i - volume da solução da amostra em mL;
- ✓ m_i - massa ou volume da amostra em g ou mL;
- ✓ R – razão de volumes.

Sempre que se traça uma nova reta, é determinado o limite de quantificação e este, controlado numa carta de controlo. O valor do limite de quantificação utilizado pelo laboratório foi definido por defeito a partir do valor obtido utilizando o padrão de quantificação, no caso do chumbo, o padrão de 5,0 $\mu\text{g/L}$. Para o cádmio, foi definido o mesmo valor, mesmo tendo este elemento um padrão de quantificação inferior ao do chumbo (0,5 $\mu\text{g/L}$). Na Tabela 36 são apresentados os limites de deteção e de quantificação determinados para os dois metais estudados, bem como os limites de quantificação definidos pelo laboratório.

Tabela 36 - Limiares analíticos calculados para o cádmio e chumbo a partir das curvas de calibração e LQ definido pelo laboratório para o método GFAAS, pelos métodos de digestão por via seca e micro-ondas.

Método de digestão	Elemento	LD_{calculado} (mg/kg)	LQ_{calculado} (mg/kg)	LD_{laboratório} (mg/kg)
Via seca	Cádmio	$0,015 \times 10^{-2}$	$0,046 \times 10^{-2}$	0,01
	Chumbo	$0,020 \times 10^{-1}$	$0,061 \times 10^{-1}$	0,01
Micro-ondas	Cádmio	$0,014 \times 10^{-2}$	$0,042 \times 10^{-2}$	0,01
	Chumbo	$0,018 \times 10^{-1}$	$0,055 \times 10^{-1}$	0,01

Como se verifica, os limites de quantificação determinados para as curvas de calibração dos elementos em estudo são inferiores aos limites de quantificação definidos pelo laboratório, tanto com a digestão da matéria orgânica por via seca como pela digestão da matéria orgânica por micro-ondas, o que é benéfico e suporta os limites estabelecidos pelo laboratório.

O critério de aceitação dos brancos é definido pelo laboratório e define que a absorvância do branco seja inferior a 1/3 da absorvância do padrão de quantificação, que no que respeita aos elementos analisados corresponde ao padrão de concentração 0,5 $\mu\text{g/L}$ para o cádmio e o de concentração 5,0 $\mu\text{g/L}$ para o chumbo. Como isto se verifica, o seu valor pode ser desprezado e sendo assim não contabilizado no cálculo das concentrações nas amostras.

No início de cada análise e de forma a validar as curvas de calibração, foram avaliados o padrão de menor concentração e o de maior concentração e de forma a verificar se a curva de calibração se manteve válida durante toda a análise a cada 5 a 10 amostras foi analisado um padrão de controlo. Assim, são considerados válidos os padrões de controlo cujo erro relativo seja igual ou inferior a 20%, percentagem de erro máxima definida pelo laboratório. Na Tabela 37 estão representados os erros relativos obtidos na análise dos padrões de controlo utilizados.

Tabela 37 - Erro relativo para a análise dos padrões de controlo do cádmio e chumbo pelo método GFAAS, pelos métodos de digestão por via seca e micro-ondas (erro máximo aceitável: 20%).

Método de digestão	Elemento	Concentração de referência (µg/L)	Concentração obtida (µg/L)	Erro relativo (%)	Classificação
Via seca	Cádmio	0,500	0,458	8,5	Aceitável
		1,00	0,852	14,8	Aceitável
		1,50	1,46	2,5	Aceitável
	Chumbo	5,00	5,82	16,4	Aceitável
		25,0	25,5	1,9	Aceitável
		30,0	29,5	1,8	Aceitável
Micro-ondas	Cádmio	0,500	0,510	2,0	Aceitável
		1,50	1,43	4,5	Aceitável
	Chumbo	5,00	5,80	16,0	Aceitável
		30,0	29,6	1,2	Aceitável
		30,0	27,7	7,7	Aceitável

Todos os padrões de controlo são classificados como aceitáveis, para os dois métodos de pré-tratamento de amostra, apresentando os valores obtidos de erros relativos entre 2,5 e 14,8 % no caso do cádmio e entre 1,8 e 16,4 no caso do chumbo, para digestão da matéria orgânica por via seca, e valores de erros relativos entre 2,0 e 4,5 % para o cádmio e entre 1,2 e 16,0 % para o chumbo, quando o pré-tratamento foi realizado no micro-ondas. A aceitação de todos os padrões de controlo comprova que as curvas de calibração se mantiveram válidas nas duas análises.

5.2.2. Avaliação do desempenho do método e do analista

De forma a avaliar o desempenho do método e do analista na determinação de cádmio e chumbo foram analisadas amostras utilizadas em circuitos interlaboratorial, sendo que uma delas, a amostra *Soya Flour T07204* (FAPAS), foi analisada em duplicado para os dois metais pelas duas vias de digestão de amostra. Para o cádmio, foram analisadas também em duplicado as amostras *Soya Flour T07226*, *Chilli Powder T07124*, *Offal (Liver) T07199* e *Offal (Liver) T07221*. Os resultados obtidos estão apresentados nas Tabelas 38, 39 e 40.

Nota: FAPAS (Food Analysis Performance Assessment Scheme) é um provedor de ensaios de proficiência reconhecido internacionalmente para o setor dos alimentos.

Tabela 38 - Resultados obtidos para a análise de cádmio e chumbo na amostra *Soya Flour* T07204 pelo método GFAAS.

Método de digestão	Elemento	Amostra	Resultado obtido (mg/kg)	Média (mg/kg)	Desvio relativo (%)
Via seca	Cádmio	<i>Soya Flour</i> T07204	$(4,9_6 \pm 0,2_1) \times 10^{-1}$	$(4,8_8 \pm 0,2_1) \times 10^{-1}$	3,5
			$(4,7_9 \pm 0,2_1) \times 10^{-1}$		
	Chumbo		$(5,2_0 \pm 0,1_3) \times 10^{-1}$	$(5,1_2 \pm 0,1_3) \times 10^{-1}$	3,1
			$(5,0_4 \pm 0,1_3) \times 10^{-1}$		
Micro-ondas	Cádmio	<i>Soya Flour</i> T07204	$(3,7_5 \pm 0,1_8) \times 10^{-1}$	$(3,7_9 \pm 0,2_0) \times 10^{-1}$	2,1
			$(3,8_3 \pm 0,2_3) \times 10^{-1}$		
	Chumbo		$(6,1_8 \pm 0,4_6) \times 10^{-1}$	$(6,2_5 \pm 0,5_1) \times 10^{-1}$	2,1
			$(6,3_1 \pm 0,5_5) \times 10^{-1}$		

Os resultados obtidos para os duplicados foram, pelo método de digestão da matéria orgânica por via seca, de 3,5% para o cádmio e 3,1 % para o chumbo. No caso da digestão da matéria orgânica por micro-ondas, o resultado para os dois metais foi o mesmo, 2,1%. Uma vez que o desvio relativo máximo aceitável é de 20% e os valores obtidos para o cádmio e para o chumbo, pelos dois métodos de digestão de amostra, foram bastante inferiores, conclui-se que o método apresenta uma boa precisão.

Para avaliar o desempenho do método e do analista, foram calculados os *Z-score*. Uma vez que no relatório de ensaio os valores estão expressos em unidades de $\mu\text{g}/\text{kg}$, também serão utilizadas as mesmas unidades na tabela abaixo.

Tabela 39 - *Z-scores* da amostra *Soya Flour* T07204 obtidos para a análise de chumbo do cádmio, pelo método GFAAS.

Método de digestão	Elemento	Amostra	Valor obtido ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Valor de referência ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Z - score
Via seca	Cádmio	<i>Soya Flour</i> T07204	488 ± 21	457	0,377
	Chumbo		512 ± 13	607	0,905
Micro-ondas	Cádmio		379 ± 20	457	0,948
	Chumbo		625 ± 51	607	0,171

Os valores obtidos para os dois metais foram satisfatórios ($|Z\text{-score}| \leq 2$). Quando é feita a digestão da matéria orgânica por via seca, obtiveram-se valores de 0,377 para o cádmio e 0,905 para o chumbo. Pelo método de digestão da matéria orgânica por micro-ondas, os valores obtidos de *Z-score* foram, para o cádmio e para o chumbo de, 0,948 e de 0,171, respetivamente.

Os resultados demonstram a exatidão do método na determinação destes dois metais. Pode concluir-se deste modo que os dois métodos são adequados à determinação de cádmio e chumbo e que o analista apresentou um bom desempenho na sua aplicação.

Com o fim de verificar se as amostras FAPAS se encontravam ainda em condições de uso, procedeu-se à determinação e comparação destas amostras com amostras FAPAS adquiridas mais recentemente, fazendo a determinação do cádmio por GFAAS, com digestão da matéria orgânica por micro-ondas. Os resultados estão expressos na Tabela 40.

Tabela 40 - Resultados obtidos para a análise de cádmio em amostras FAPAS pelo método GFAAS, com digestão da matéria orgânica por micro-ondas.

Método de digestão	Elemento	Amostra	Resultado obtido (mg/kg)	Média (mg/kg)	Desvio relativo (%)
Micro-ondas	Cádmio	<i>Soya Flour T07204</i>	$(3,7_5 \pm 0,1_8) \times 10^{-1}$	$(3,7_9 \pm 0,2_1) \times 10^{-1}$	2,1
			$(3,8_3 \pm 0,2_3) \times 10^{-1}$		
		<i>Soya Flour T07226</i>	$(4,1_3 \pm 0,1_8) \times 10^{-1}$	$(4,0_2 \pm 0,09_0) \times 10^{-1}$	5,5
			$(3,9_1 \pm 0,01_3) \times 10^{-1}$		
		<i>Chilli Powder T07124</i>	$(1,5_1 \pm 0,07_3) \times 10^{-1}$	$(1,6_2 \pm 0,07_3) \times 10^{-1}$	13,6
			$(1,7_3 \pm 0,07_2) \times 10^{-1}$		
<i>Offal (Liver) T07199</i>	$(5,4_4 \pm 0,4_5) \times 10^{-1}$	$(5,4_4 \pm 0,4_6) \times 10^{-1}$	0,2		
	$(5,4_3 \pm 0,4_6) \times 10^{-1}$				
<i>Offal (Liver) T07221</i>	$(8,9_7 \pm 0,5_2) \times 10^{-1}$	$(8,9_2 \pm 0,4_9) \times 10^{-1}$	1,2		
	$(8,8_6 \pm 0,4_6) \times 10^{-1}$				

Os resultados obtidos para os duplicados de *Soya Flour T07204* e de *Soya Flour T07226* foram, respetivamente, de 2,1% e de 5,5 %. Para o *Offal (Liver) T07199* e para o *Offal (Liver) T07221* obtiveram-se valores de 0,2 e de 1,2, respetivamente. Para o *Chilli Powder T07124* obteve-se um resultado de 13,6. Uma vez que o desvio relativo máximo aceitável é de 20% e os valores obtidos foram bastante inferiores, tanto para as FAPAS mais recentes como para as mais antigas, conclui-se que estas estavam ainda em boas condições de uso. No caso da amostra FAPAS *Chilli Powder T07124*, esta demonstra um desvio superior às restantes amostras, isto pode dever-se à complexidade desta matriz.

Para avaliar o desempenho do método e do analista, foram calculados os *Z*-score. Uma vez que no relatório de ensaio os valores estão expressos em unidades de $\mu\text{g}/\text{kg}$, também serão utilizadas as mesmas unidades na tabela abaixo. Para a amostra *Chilli Powder T07124* não foi possível efetuar o cálculo do *Z*-score, uma vez que esta não foi avaliada pela *Silliker* em ensaio

laboratorial até a data em que terminou o estágio. Assim, são apresentados os cálculos dos Z-scores para as amostras *Soya Flour* (T07226 e T07204) e *Offal (Liver)* (T07221 e T07199).

Tabela 41 - Z-scores das amostras *Soya Flour* e *Offal (Liver)* (FAPAS) obtidos para a análise do cádmio, pelo método GFAAS.

Elemento	Amostra	Valor obtido ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Valor de referência ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Z - score
Cádmio	<i>Soya Flour</i> T07204	379 \pm 21	457	0,95
	<i>Soya Flour</i> T07226	402 \pm 9,0	469	0,79
	<i>Offal (Liver)</i> T07199	544 \pm 46	713	1,4
	<i>Offal (Liver)</i> T07221	892 \pm 49	1060	1,0

Os valores obtidos para o metal foram satisfatórios ($|\text{Z-score}| \leq 2$). Obtiveram-se valores de 0,95 e de 0,79 para o *Soya Flour* T07204 e T07226, respectivamente. Os valores obtidos de Z-score para o *Offal (Liver)* T07199 e T07221 foram de 1,4 e de 1,0, respectivamente. Os resultados demonstram a exatidão do método na determinação deste metal. Pode concluir-se deste modo que o método é adequado à determinação de cádmio e que o analista apresentou um bom desempenho na sua aplicação.

5.2.3. Resultados obtidos nas análises das amostras

Determinou-se o teor de cádmio em quatro alimentos normalmente analisados no laboratório da *Silliker*, em rotina por GFAAS e digestão da matéria orgânica por via seca. Para validar os resultados e o desempenho do método analisou-se um material de referência, o padrão diário de controlo (DPCS) do cádmio e do chumbo, *Biscuit*, em duplicado. Os resultados obtidos estão na Tabela 42, 43 e 44.

Tabela 42 - Resultados obtidos para a análise da amostra diária de controlo (DPC) do cádmio e do chumbo pelo método GFAAS para avaliação do desempenho do método.

Elemento	DPC	Valor obtido (mg/kg)	Limite inferior (mg/kg)	Limite superior (mg/kg)	Desempenho
Cádmio	<i>Biscuit</i>	$(1,3_4 \pm 0,04_7) \times 10^{-1}$	$0,7_0 \times 10^{-1}$	$1,5_0 \times 10^{-1}$	Aceitável
		$(1,0_8 \pm 0,04_9) \times 10^{-1}$			Aceitável
Chumbo	<i>Biscuit</i>	$(2,1_4 \pm 0,05_7) \times 10^{-1}$	$1,6_0 \times 10^{-1}$	$2,7_0 \times 10^{-1}$	Aceitável
		$(2,5_2 \pm 0,06_5) \times 10^{-1}$			Aceitável

Os DPCS apresentam um desempenho aceitável para os dois metais, o que significa que os resultados obtidos nas análises encontram-se entre os limites definidos por uma carta de controlo construída pelo laboratório para cada um dos elementos.

Nas Tabelas 43 e 44, são apresentados os teores de cádmio e de chumbo obtidos para as amostras analisadas e os teores máximos legislados de cádmio e de chumbo em alimentos apresentados no Regulamento (UE) N^o 488/2014 da Comissão de 12 de maio de 2014 que altera o Regulamento (CE) n^o 1881/2006 no que diz respeito aos teores máximos de cádmio nos géneros alimentícios ^[43] e no Regulamento (CE) N^o 1881/2006 da Comissão de 19 de Dezembro de 2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios ^[11].

Tabela 43 - Teor de cádmio determinado pelo método GFAAS em várias amostras de alimentos e teor máximo legislado ^[43].

Amostra	Teor de cádmio (mg/kg)	Teor máximo legislado ^[43] (mg/kg de peso fresco)
Cevada	< LQ (0,01)	$1,0 \times 10^{-1}$
Atum	$(0,8_8 \pm 0,03_6) \times 10^{-1}$	$1,0 \times 10^{-1}$
Alimento infantil	< LQ (0,01)	-
Sardinha	< LQ (0,01)	$2,5 \times 10^{-1}$
Pescada	$(2,1_0 \pm 0,09_8) \times 10^{-2}$	$0,50 \times 10^{-1}$

Os teores de cádmio obtidos para todos os alimentos analisados encontram-se abaixo dos teores máximos legislados, estando estes aptos para o consumo humano no que diz respeito aos níveis deste metal.

Dos alimentos analisados observa-se um maior teor de cádmio no atum e no pescado, nos restantes alimentos, este encontra-se em quantidades vestigiais, o que é extremamente favorável.

Tabela 44 - Teor de chumbo determinado pelo método GFAAS em várias amostras de alimentos e teor máximo legislado ^[11].

Amostra	Teor de chumbo (mg/kg)	Teor máximo legislado ^[11] (mg/kg de peso fresco)
Cevada	< LQ (0,01)	$20,0 \times 10^{-2}$
Atum	$(1,2_0 \pm 0,1_6) \times 10^{-2}$	$30,0 \times 10^{-2}$
Alimento infantil	< LQ (0,01)	$20,0 \times 10^{-2}$
Sardinha	< LQ (0,01)	$30,0 \times 10^{-2}$
Pescada	< LQ (0,01)	$30,0 \times 10^{-25}$

Os teores de chumbo obtidos para os alimentos analisados encontram-se abaixo dos teores máximos legislados, estando estes, assim, aptos para o consumo humano no que diz respeito aos níveis deste metal.

Com exceção do atum, todas as amostras apresentam teores inferiores ao limite de quantificação (0,01 mg/kg), o que indica que estas ou não possuem chumbo ou que este se encontra em quantidades vestigiais, o que é muito favorável.

5.3. Determinação do sódio em vinhos e validação do método

Ao longo do estágio na *Silliker*, procurou-se realizar o trabalho de validação do método de determinação do sódio por espectrofotometria de absorção atômica nos vinhos. Este método de validação refere-se apenas às matrizes vinhos tranquilo, frisante, espumante e licoroso.

Para validar este método foram realizados os ensaios necessários e pertinentes para cada um dos seguintes critérios:

- ✓ Precisão:
 - ✓ Repetibilidade.
 - ✓ Precisão intermédia.
- ✓ Exatidão
- ✓ Limite de quantificação.
- ✓ Linearidade.
- ✓ Gama de trabalho.
- ✓ Incerteza.

5.3.1. Precisão

A precisão avalia a concordância dos resultados obtidos em ensaios espaçados no tempo e independentes, repetidos sobre uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas, aplicando o mesmo método de análise, nas condições normais de funcionamento do laboratório com respeito aos operadores e equipamento utilizado. Pressupõe-se que as características da amostra não variam durante o intervalo de tempo considerado [99]. A dispersão dos resultados pode ser avaliada em condições de repetibilidade, condições de precisão intermédia ou em condições de reprodutibilidade [104]. A precisão pode ser expressa pelo coeficiente de variação (CV), que é calculado a partir da equação 8.

$$(8) \quad CV = \frac{S}{\bar{x}} \times 100$$

S – desvio padrão;

\bar{x} – Média dos valores considerados.

Na tabela abaixo está representada a relação entre a concentração do analito e a precisão esperada a nível do desvio padrão relativo ou coeficiente de variação [105].

Tabela 45 - Precisão esperada, a nível do coeficiente de variação (CV), em função da concentração de analito ^[105].

% Analito	Proporção de analito	Unidade	CV (%)
100	1	100 %	1,3
10	10 ⁻¹	10 %	2,8
1	10 ⁻²	1 %	2,7
0,01	10 ⁻³	0,1 %	3,7
0,001	10 ⁻⁴	100 mg/kg	5,3
0,0001	10 ⁻⁵	10 mg/kg	7,3
0,00001	10 ⁻⁶	1 mg/kg	11
0,000001	10 ⁻⁷	100 µg/kg	15
0,0000001	10 ⁻⁸	10 µg/kg	21
0,00000001	10 ⁻⁹	1 µg/kg	30

Para o cálculo da precisão foram analisados 5 replicados das diferentes matrizes BIPEA, identificadas no ponto 4.3. deste relatório, para o sódio.

5.3.1.1. Repetibilidade

A repetibilidade avalia a precisão de um método de ensaio efetuado em condições idênticas, ou seja, refere-se a ensaios efetuados sobre uma mesma amostra nas mesmas condições (mesmo laboratório, analista, equipamento, tipo de reagentes e curtos intervalos de tempo) ^[99].

Para determinar a repetibilidade de um método, efetuam-se uma série de medições ($n \geq 10$) sobre uma mesma amostra ou padrões, em condições de repetibilidade e determinam-se os parâmetros a seguir descritos.

O limite de repetibilidade (r), calcula-se através da equação (9) utilizando a variância de repetibilidade associada aos resultados considerados (S_{ri}^2), determinada a partir da equação (10). O seu valor deve ser inferior à diferença absoluta entre dois resultados de ensaio obtidos em condições de repetibilidade, com uma probabilidade normalmente de 95%.

$$(9) \quad r = 2,8 \sqrt{S_{ri}^2}$$

$$(10) \quad S_{ri}^2 = \frac{(n_{wi}-1) \cdot S_{wi}^2}{(n_{wi}-1)}$$

($n_{wi} - 1$) – Graus de liberdade da série de análises;

S_{wi}^2 – Variância associada aos resultados considerados.

Para demonstração da repetibilidade usaram-se os resultados dos 10 replicados obtidos da análise das matrizes identificadas no ponto 4.3., deste relatório, realizados no mesmo dia. Os resultados obtidos para avaliar a precisão, em condições de repetibilidade: média, desvio padrão de repetibilidade, limite de repetibilidade e coeficiente de variação de repetibilidade, estão representados na Tabela 46.

Tabela 46 – Estudo da repetibilidade para o sódio na matriz vinho

Matriz	Média (mg/kg)	S_{ri}^2 (mg/kg)	Desvio padrão	r (mg/kg)	CV (%)
Bipea 2014 - Wine Flavoured Drink	20,678	0,038	0,194	0,543	0,18
Bipea 2014 - Red Wine	11,486	0,067	0,258	0,722	0,58
Bipea 2014 - White Wine	21,156	0,035	0,186	0,521	0,17
Bipea 2015 – Mistelle wine	21,289	0,184	0,429	1,202	0,84
Bipea 2014 - Semi-sparkling wine	61,875	1,512	1,229	3,442	2,44

Os limites de repetibilidade para as matrizes apresentam valores entre os 0,521 e os 3,442 mg/kg e os coeficientes de variação de repetibilidade variam entre os 0,17 e os 2,44 %. De acordo com a Tabela 45, para teores na gama dos 10 - 100 mg/kg esperam-se coeficientes de variação inferiores a 7,3 e a 5,3 %. Assim, a precisão do método em condições de repetibilidade, para as três matrizes está dentro dos valores esperados.

Para se comparar a homogeneidade das variâncias dos vinhos, procedeu-se à realização do teste de *Cochran*, aplicando a seguinte equação (11).

$$(11) \quad C_{calculado} = \frac{S_{max}^2}{\sum_{i=1}^K S_i^2}$$

S_{max}^2 – maior variância;

$\sum_{i=1}^K S_i^2$ – somatório de todas as variâncias.

Tabela 47 - Teste de Cochran para as cinco matrizes de vinhos estudadas.

Número de matrizes	Maior variância	1,512	Valor crítico tabelado – C_c (5 %)	0,4241	Avaliação	Rejeitar a maior variância	Conclusão	Eliminar a maior variância e repetir o teste.
5	C de Cochran (calculado)	0,824						
Número de matrizes	Maior variância	0,184	Valor crítico tabelado – C_c (5 %)	0,5017	Avaliação	Rejeitar a maior variância	Conclusão	Eliminar a maior variância e repetir o teste.
4	C de Cochran (calculado)	0,571						
Número de matrizes	Maior variância	0,067	Valor crítico tabelado – C_c (5 %)	0,6167	Avaliação	$C_{Calc} < C_{tab5\%}$	Conclusão	Valor aceite
3	C de Cochran (calculado)	0,482						
Valor do limite da repetibilidade (média dos resultados da coluna "Limite da repetibilidade")								0,5948

Tabela 48 - Matrizes eliminadas (após execução do teste de Cochran).

Matriz	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9	Ensaio 10
<i>Bipea 2015 – Mistelle wine</i>	20,7	21,59	21,95	21,26	21,32	21,18	21,61	21,57	21,18	20,53
<i>Bipea 2014 - Semi-sparkling wine</i>	61,92	62,64	59,15	62,58	61,05	62,38	62,9	60,64	62,93	62,56

Como se verifica na Tabela 47, foi necessário rejeitar 2 matrizes a *Bipea 2015 – Mistelle wine* e a *Bipea 2014 – Semi-sparkling wine*, uma vez que após o cálculo do teste de *Cochran* o $G_{\text{calculado}}$ de cada uma destas matrizes se mostrou superior ao G tabelado a 5%. Na Tabela 48 estão demonstradas as matrizes que foram eliminadas após execução do teste de *Cochran*.

O teste de Grubbs tem como objetivo detetar a presença de valores “anormais” nos resultados amostrais, designados de *outliers*. Este compara o desvio existente entre o “valor suspeito” com o desvio padrão da amostra, sendo que o valor suspeito é aquele se se encontra mais afastado do valor da média amostral ^[106]. A fórmula de cálculo para o teste de *Grubbs* está representada na equação (12).

$$(12) \quad G = \frac{\max |x_i - \bar{x}|}{S_x} = \frac{|x_? - \bar{x}|}{S_x}$$

\bar{x} – média;

S_x – desvio padrão dos valores experimentais;

$x_?$ – valor suspeito

Tabela 49 - Teste de Grubbs na determinação do sódio por FAAS para a matriz vinhos.

Matriz	População	Valor crítico 5%	Valor mínimo	Gp Valor mínimo	Teste ao valor mínimo	Valor máximo	Gp Valor máximo	Teste ao valor máximo
<i>Bipea 2014 - Wine Flavoured Drink</i>	10	2,482	20,39	1,485	Aceitável	21,00	1,660	Aceitável
<i>Bipea 2014 - Red Wine</i>	10	2,482	11,01	1,846	Aceitável	11,78	1,140	Aceitável
<i>Bipea 2014 - White Wine</i>	10	2,482	20,82	1,807	Aceitável	21,39	1,259	Aceitável

Foi feita a determinação do teste de Grubbs, tanto para o valor mínimo, como para o valor máximo de cada matriz. Por observação da tabela, pode concluir-se que todos os valores do teste de Grubbs são aceitáveis uma vez que o $G_{\text{calculado}}$, em todas as matrizes deu menor que o G_{tabelado} , para um nível de confiança de 95%.

5.3.1.2. Precisão intermédia

A precisão intermédia refere-se à precisão avaliada, sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, o mesmo local, e medições repetidas ao longo de um período extenso de tempo, fazendo variar uma ou mais condições (diferentes analistas; diferentes equipamentos; diferentes épocas; com/sem verificação da calibração, etc.) [107]. Esta medida de precisão é a mais representativa da variabilidade dos resultados habitual num laboratório [104].

Para determinar a precisão intermédia de um método, efetuam-se n medições em replicado, duplicado ou em ensaio único, sobre a amostra, nas condições pré-definidas. No caso de as medições serem realizadas em duplicado, como foi o caso, aplica-se a equação 13 para determinar o desvio padrão da precisão intermédia (S_i).

$$(13) \quad S_i = \sqrt{\frac{1}{2t} \sum_{j=1}^t (y_{j1} - y_{j2})^2}$$

t – número de amostras ensaiadas;

j – número da amostra (que vai de 1 a t amostras);

y_{j1} – primeiro resultado obtido para a amostra j ;

y_{j2} – segundo resultado obtido para a amostra j .

Para avaliar a precisão intermédia do método efetuou-se uma série de medições sobre as mesmas matrizes utilizadas nos ensaios de repetibilidade, em condições de precisão intermédia, de forma a avaliar o efeito do tempo nos resultados das medições. Para isso foram realizadas 5 medições em duplicado, efetuadas em dias diferentes. Da Tabela 50 à 54 são apresentados o desvio padrão da precisão intermédia, o limite da precisão intermédia (equação 14) e coeficiente de variação da precisão intermédia determinados para as cinco matrizes estudadas.

$$(14) \quad r_i = \frac{s_i \times 2,8}{\bar{x}} \times 100$$

Tabela 50 - Resultados obtidos nos ensaios realizados para avaliar a precisão, em termos de precisão intermédia, do método de determinação de Na, para a matriz *Bipea 2014 - Wine Flavoured Drink*.

Sódio mg/L						
Data	Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A - B	(A - B)²	\bar{Y}
31-10-2014	<i>Bipea</i>	20,8	20,8	0,0	0,0	20,8
05-11-2014	<i>2014 - Wine Flavoured Drink</i>	23,2	21,9	1,3	1,7	22,6
11-11-2014		19,7	19,6	0,1	0,01	19,7
14-11-2014		19,8	20,3	0,5	0,3	20,1
17-11-2014		22,6	22,8	0,2	0,04	22,7
População						5
Desvio padrão da precisão intermédia (Si) (mg/kg)						0,45
Limite de precisão intermédia (mg/kg)						5,9%
CV (%)						1,6

O limite de precisão intermédia para a matriz *Bipea 2014 - Wine Flavoured Drink*, foi de 5,9% mg/kg e o coeficiente de variação de precisão intermédia de 1,6 %, valores esses que se mostraram superiores aos obtidos em condições de repetibilidade, o que era esperado devido à alteração do fator tempo nestas análises. De acordo com a Tabela 45, para teores na gama dos 10 - 100 mg/kg esperam-se coeficientes de variação inferiores a 7,3 e a 5,3 %. Assim, a precisão do método, em condições de precisão intermédia, para a matriz *Bipea 2014 - Wine Flavoured Drink* é aceitável.

Tabela 51 - Resultados obtidos nos ensaios realizados para avaliar a precisão, em termos de precisão intermédia, do método de determinação de Na, para a matriz Bipea 2014 - Red Wine.

Sódio (7-17) mg/L						
Data	Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A - B	(A - B)²	\bar{Y}
13/01/2015		11,3	11,2	0,1	0,01	11,3
16/01/2015	<i>Bipea</i>	12,8	13,6	0,8	0,64	13,2
19/01/2015	<i>2014 –</i>	13,2	14,1	0,9	0,81	13,7
27/01/2015	<i>Red Wine</i>	14,4	14,1	0,3	0,09	14,3
30/01/2015		13,1	12,9	0,2	0,04	13,0
População						5
Desvio padrão da precisão intermédia (Si) (mg/kg)						0,40
Limite de precisão intermédia (mg/kg)						8,5%
CV (%)						3,0

O limite de precisão intermédia para a matriz *Bipea 2014 – Red Wine*, foi de 8,5% mg/kg e o coeficiente de variação de precisão intermédia de 3,0 %, valores esses que se mostraram superiores aos obtidos em condições de repetibilidade, o que era esperado devido à alteração do fator tempo nestas análises. De acordo com a Tabela 45, para teores na gama dos 10 - 100 mg/kg esperam-se coeficientes de variação inferiores a 7,3 e a 5,3 %. Assim, a precisão do método, em condições de precisão intermédia, para a matriz *Bipea 2014 – Red Wine* é aceitável.

Tabela 52 - Resultados obtidos nos ensaios realizados para avaliar a precisão, em termos de precisão intermédia, do método de determinação de Na, para a matriz *Bipea 2014 - White Wine*.

Sódio (17-22) mg/L						
Data	Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A - B	(A - B)²	\bar{Y}
13/01/2015	<i>Bipea 2014 – White Wine</i>	21,3	21,1	0,20	0,04	21,2
16/01/2015		21,2	20,1	1,1	1,21	20,7
19/01/2015		20,3	21,5	1,2	1,44	20,9
27/01/2015		21,4	20,2	1,2	1,44	20,8
30/01/2015		21,1	21,6	0,5	0,25	21,4
População					5	
Desvio padrão da precisão intermédia (Si) (mg/kg)					0,66	
Limite de precisão intermédia (mg/kg)					8,8%	
CV (%)					3,1	

O limite de precisão intermédia para a matriz *Bipea 2014 – White Wine*, foi de 8,8% mg/kg e o coeficiente de variação de precisão intermédia de 3,2 %, valores esses que se mostraram superiores aos obtidos em condições de repetibilidade, o que era esperado devido à alteração do fator tempo nestas análises. De acordo com a Tabela 45, para teores na gama dos 10 - 100 mg/kg esperam-se coeficientes de variação inferiores a 7,3 e a 5,3 %. Assim, a precisão do método, em condições de precisão intermédia, para a matriz *Bipea 2014 – White Wine* é aceitável.

Tabela 53 - Resultados obtidos nos ensaios realizados para avaliar a precisão, em termos de precisão intermédia, do método de determinação de Na, para a matriz Bipea 2015 - Mistelle Wine.

Sódio (17-27) mg/L						
Data	Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A - B	(A - B)²	\bar{Y}
20/02/2015		22,0	21,0	1,0	1,0	21,5
05/03/2015	<i>Bipea 2014</i>	22,0	21,0	1,0	1,0	21,5
11/03/2015	<i>- Mistelle</i>	21,0	20,3	0,7	0,49	20,7
13/03/2015	<i>Wine</i>	20,9	20,6	0,3	0,09	20,8
19/03/2015		24,3	23,8	0,5	0,25	24,1
População					5	
Desvio padrão da precisão intermédia (Si) (mg/kg)					0,53	
Limite de precisão intermédia (mg/kg)					6,9%	
CV (%)					2,4	

O limite de precisão intermédia para a matriz *Bipea 2015 – Mistelle Wine*, foi de 6,9 % mg/kg e o coeficiente de variação de precisão intermédia de 2,4 %, valores esses que se mostraram superiores aos obtidos em condições de repetibilidade, o que era esperado devido à alteração do fator tempo nestas análises. De acordo com a Tabela 45, para teores na gama dos 10 - 100 mg/kg esperam-se coeficientes de variação inferiores a 7,3 e a 5,3 %.. Assim, a precisão do método, em condições de precisão intermédia, para a matriz *Bipea 2015 – Mistelle Wine* é aceitável.

Tabela 54 - Resultados obtidos nos ensaios realizados para avaliar a precisão, em termos de precisão intermédia, do método de determinação de Na, para a matriz Bipea 2014 - Semi-sparkling Wine.

Sódio (53-63) mg/L						
Data	Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A - B	(A - B)²	\bar{Y}
09/02/2015	<i>Bipea 2014 – Semi - parkling Wine</i>	62,9	61,1	1,8	3,24	62,0
05/03/2015		57,0	56,0	1,0	1,0	56,5
11/03/2015		55,5	53,9	1,6	2,56	54,7
13/03/2015		55,9	53,1	2,8	7,84	54,5
19/03/2015		58,4	56,5	1,9	3,61	57,5
População					5	
Desvio padrão da precisão intermédia (Si) (mg/kg)					1,35	
Limite de precisão intermédia (mg/kg)					6,6%	
CV (%)					2,5	

O limite de precisão intermédia para a matriz *Bipea 2014 – Semi-sparkling Wine*, foi de 6,6 % mg/kg e o coeficiente de variação de precisão intermédia de 2,5 %, valores esses que se mostraram superiores aos obtidos em condições de repetibilidade, o que era esperado devido à alteração do fator tempo nestas análises. De acordo com a Tabela 45, para teores na gama dos 10 - 100 mg/kg esperam-se coeficientes de variação inferiores a 7,3 e a 5,3 %.. Assim, a precisão do método, em condições de precisão intermédia, para a matriz *Bipea 2014 – Semi-sparkling Wine* é aceitável.

5.3.2. Exatidão

Segundo o IPAC, tem-se como exatidão a aproximação entre um valor medido e um valor verdadeiro de uma medição. Refere-se, quando aplicado a um conjunto de dados, à combinação da avaliação dos erros sistemáticos com a avaliação dos erros aleatórios.

A exatidão foi medida por matriz, fazendo a comparação entre o valor obtido nas medições, com os valores e os limites superior e inferior certificados. Os valores obtidos estão representados na Tabela 55.

Tabela 55 - Parâmetros da exatidão para as matrizes dos vinhos estudados.

Matriz	Valor medido mg/L	Valor certificado mg/L	Limite inferior mg/L	Limite superior mg/L	Avaliação da exatidão
<i>Red Wine</i>	11,29	12,00	7,00	17,00	Boa
<i>White Wine</i>	21,16	22,00	17,00	27,00	Boa
<i>Mistelle Wine</i>	21,29	22,00	17,00	27,00	Boa
<i>Semi-sparkling Wine</i>	61,88	58,00	53,00	63,00	Boa

Os valores medidos para as matrizes estudadas tomaram valores entre os 11,29 e os 61,88 mg/kg. Assim, em comparação com os valores de referência, pode dizer-se que todas as matrizes estudadas apresentam boa exatidão, uma vez que os valores obtidos encontram-se dentro dos limites estabelecidos pela entidade de referência.

5.3.3. Limites de quantificação

Esta série de trabalho foi executada em 2014-10-31 e apresenta, os resultados da matriz *Bipea 2014 - Wine Flavoured Drink*.

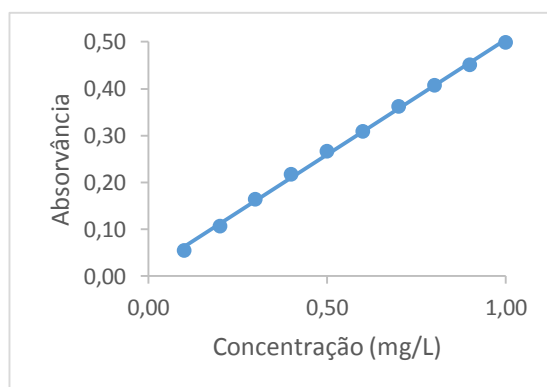


Figura 17 - Curva de calibração obtida para o Na, pelo método de FAAS no em 2014-10-31.

Construiu-se uma curva de calibração para o sódio (Figura 17), e os resultados obtidos estão representados na Tabela 56. A curva de calibração apresenta um bom ajuste ($r > 0,999$).

Tabela 56 - Parâmetros da reta de calibração efetuada para a determinação do sódio por FAAS, no dia 2014-10-31.

Elemento	Equação da reta de calibração*
Sódio	$y = (0,4910 \pm 0,0060)x + (0,0141 \pm 0,0040)$

O limite de quantificação é determinado sempre que se traça uma nova reta e controlado numa carta de controlo. O valor utilizado pelo laboratório para este limite foi definido por defeito a partir do valor obtido utilizando o padrão de quantificação, que nestes casos é o padrão menor concentração. Na Tabela 57 são apresentados os limites de deteção e quantificação determinados para cada um dos elementos, assim como os limites de quantificação definidos pelo laboratório.

Tabela 57 - Limiares analíticos calculados a partir das curvas de calibração e LQ definidos pelo laboratório para a determinação do Na, no dia 2014-10-31.

Elemento	LD_{calculado} (mg/kg)	LQ_{calculado} (mg/kg)	LQ_{laboratório} (mg/kg)
Sódio	0,3899	1,1818	1,0

Para o limite de quantificação do sódio, os resultados não foram os esperados, sendo o $LQ_{calculado} > LQ_{laboratório}$, desta forma, o laboratório deve redefinir o LQ a apresentar ao cliente. Para verificar se os limiares analíticos estão dentro dos limites estabelecidos pelo laboratório, é feita uma pequena validação, representada na Tabela 57.

Tabela 58 - Validação dos limiares analíticos do método da determinação do sódio por FAAS.

	Limite de quantificação	Limite deteção
Média	0,8770	0,2894
Desvio padrão	0,2199	0,07255
n	138	138

Pode verificar-se que tanto os limites de quantificação como os limites de deteção se encontram abaixo dos limites estabelecidos pelo laboratório para a determinação do sódio por FAAS.

De forma a verificar a concordância dos valores obtidos em cada análise efetuada pelo método de FAAS, foi construída uma carta de controlo através dos limites de quantificação. A tabela abaixo mostra os valores utilizados para a construção da carta em 2014-10-31.

Tabela 59 - Valores utilizados na construção da carta de controlo do limite de quantificação do método da determinação do sódio por FAAS.

Média	Desvio padrão	$\bar{x} + 1\sigma$	$\bar{x} + 2\sigma$	$\bar{x} + 3\sigma$	$\bar{x} - 1\sigma$	$\bar{x} - 2\sigma$	$\bar{x} - 3\sigma$
0,9835	0,3315	1,3149	1,6464	1,9779	0,6520	0,3206	-0,01090

0,6000	0,571	4,8	Aceitável
0,6000	0,600	0,0	Aceitável
0,4000	0,348	13,0	Aceitável
0,5000	0,441	11,8	Aceitável
0,6000	0,538	10,3	Aceitável
0,7000	0,628	10,3	Aceitável
0,4000	0,348	13,0	Aceitável
0,5000	0,443	11,4	Aceitável
0,6000	0,525	12,5	Aceitável

Os resultados obtidos para todos os padrões de controlo, exceto o de menor concentração, são aceitáveis, apresentando um erro relativo máximo de 13,0 %. A aceitação dos padrões de controlo comprova que as curvas de calibração se mantiveram válidas para todas as análises.

5.3.4. Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, dentro de uma determinada faixa de concentração.

A linearidade é registada diariamente num impresso elaborado pela empresa, como se pode ver pelas Tabelas 55, 56 e 58 e pela Figura 18.

5.3.5. Gama de trabalho

Para o método de determinação do sódio por FAAS, a gama de trabalho está compreendida entre 1 e 100 mg/L.

5.3.6. Incerteza

Segundo a ISO, a incerteza corresponde a um parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão da quantidade de valores a ser atribuída a uma medida, com base na informação utilizada.

Os resultados obtidos para as incertezas estão nas Tabelas 61 e 62, abaixo representadas (ver anexo A).

Nota: Na estimativa da incerteza expandida foi considerado como fator de expansão $k=2$.

Tabela 61 - Dados relativos aos certificados de análise das matrizes utilizadas na validação do método da determinação do sódio por FAAS.

Matriz	Valor medido (mg/kg)	Valor certificado (mg/kg)	Limite inferior (mg/kg)	Limite superior (mg/kg)	Incerteza certificado absoluta
W F D	20,68	23	Circuito não avaliado		1
R W	11,29	12	7	17	1
W W	21,16	22	17	27	1
Mi	21,29	22	17	27	1
Ss W	61,88	58	53	63	2

Pela observação da Tabela 61 pode dizer-se que valores de todas as BIPEAS encontram-se dentro dos limites estabelecidos e próximos do valor certificado para cada matriz, o que é favorável e sustenta os parâmetros estabelecidos pelo laboratório.

Tabela 62 - Dados relativos ao cálculo da incerteza do método da determinação do sódio por FAAS.

Matriz	Precisão intermédia		Desvio padrão precisão intermédia	Incerteza		
	Relativa (%)	Absoluta		Combinada	Expandida	Expandida relativa
W F D	2,0825	0,4306	0,4405	1,0	2,0	9,7
R W	3,0866	0,3485	0,4035	1,0	2,0	17,4
W W	3,9031	0,8257	0,8264	1,2	2,4	11,3
Mi	2,4199	0,5152	0,5350	1,2	2,4	9,9
Ss W	2,2225	1,3752	1,253	2,2	4,4	7,1

5.3.7. Apresentação dos resultados analíticos

A apresentação dos resultados analíticos deve ser feita de forma correta e coerente. O número de algarismos significativos do resultado é estabelecido tendo por base um critério que pode ser: especificações descritas na norma; incerteza estimada; precisão do método ^[18].

Tabela 63 - Apresentação dos resultados analíticos da precisão Intermédia do método da determinação do sódio por FAAS.

Matriz	Resultado médio (mg/ L)	Desvio padrão da Precisão intermédia (σ)	Desvio padrão da Precisão		Arredondamento	Arredondamento final para precisão intermédia
			$0,05*\sigma$	$0,5*\sigma$		
W F D	20,68	0,4405	0,0220	0,2202	0,1	0,1 (1 casa decimal)
R W	11,29	0,4034	0,0201	0,2017	0,1	
W W	21,16	0,8263	0,0413	0,4131	0,1	
Mi	21,29	0,5350	0,0267	0,2675	0,1	
Ss W	61,88	1,2527	0,0626	0,6263	0,1	

Para a apresentação dos resultados analíticos obtidos pelo cálculo da precisão intermédia do método de determinação do sódio por FAAS, é feito um arredondamento do resultado para 1 casa decimal.

6. Conclusões

Neste trabalho, as ferramentas de controlo de qualidade utilizadas - padrões de controlo, amostras de controlo, amostras de referência, monitorização dos brancos e duplicados - apresentaram-se dentro dos parâmetros definidos pelo laboratório, para os métodos de determinação dos metais estudados. Conclui-se que as curvas de calibração do cálcio, zinco, potássio e sódio, feitas por mim, foram similares às feitas pelos analistas do laboratório de MIA da Silliker, no que respeita aos valores de declive, ordenada na origem e coeficiente de correlação linear.

Foi possível a análise das amostras alimentares: bolacha, leite, produto cárnico, cevada, atum, alimento infantil, sardinha e pescada, bem como amostras de controlo diário (*Infant Cereal* e *Biscuit*) e amostras utilizadas em ensaios interlaboratoriais (*Soya Flour*, *Chilli Powder* e *Offal (Liver)*).

Para o cálcio obtiveram-se valores mais elevados na bolacha, na ordem dos $2,5 \times 10^{-2}$ g/100 g, correspondente a 26 % do VDR, seguindo-se o leite com $1,1 \times 10^{-2}$ g/100 g e do produto cárnico com $8,8 \times 10^{-3}$ g/100 g. O teor de cálcio varia de amostra para amostra.

Para o zinco obtiveram-se valores muito mais elevados no produto cárnico, na ordem dos $0,3 \times 10^{-2}$ g/100 g, correspondente a 30 % do VDR deste metal no organismo humano. Já na bolacha e no leite foram obtidos teores de zinco bastante semelhantes, $0,7 \times 10^{-3}$ e $0,4 \times 10^{-2}$, respetivamente.

Os teores de potássio determinados foram bastante semelhantes para todas as amostras analisadas, sendo no entanto, o produto cárnico a matriz que mais se destacou por excesso ($4,8 \times 10^{-1}$ g/100 g).

O sódio foi o elemento determinado onde se manifestaram maiores diferenças. O leite, sendo um produto natural obteve o menor teor ($3,1 \times 10^{-2}$ g/100 g), seguido da bolacha ($2,9 \times 10^{-1}$ g/100g) e do produto cárnico ($1,5$ g/100 g). Nota-se que os produtos processados têm um maior teor de sódio na sua composição.

O recurso a amostras de controlo permitiu concluir que a técnica de FAAS, na determinação do sódio, pelos métodos de digestão da matéria orgânica por via seca e por micro-ondas conduzem a resultados bastante semelhantes (bolacha: $2,9 \times 10^3$ e $3,0 \times 10^3$ g/100 g; leite: $0,3 \times 10^{-2}$ e $0,2 \times 10^{-2}$ g/100 g; produto cárnico: $1,5$ e $1,6$ g/100 g, respetivamente). Apesar da digestão da matéria orgânica por micro-ondas ser um método que exige uma maior disponibilidade financeira na aquisição, o facto da digestão por via seca ser um método bastante demorado e conduzir a maiores contaminações de amostra (digestão em sistema aberto), torna a digestão por micro-ondas um método desejável. A análise destas amostras mostrou também que a metodologia utilizada foi adequada.

A técnica de GFAAS, após digestão da matéria orgânica por via seca e por micro-ondas, mostrou ser adequada na determinação cádmio e chumbo. Também os dois processos de digestão da amostra conduziram a resultados bastante semelhantes. Na determinação do teor de cádmio e chumbo nas amostras analisadas, com digestão da matéria orgânica por via seca e por micro-ondas, encontraram-se teores abaixo dos teores máximos legislados. Assim, na cevada, no alimento infantil e na sardinha obtiveram-se valores menores que o limite de quantificação definido pelo laboratório (0,01 mg/kg) para os dois metais; para o atum obtiveram-se teores para o cádmio e para o chumbo de $0,9 \times 10^{-1}$ mg/kg (máximo legislado: $1,0 \times 10^{-1}$ mg/kg) e de $1,2 \times 10^{-2}$ mg/kg (máximo legislado: 30×10^{-2} mg/kg), respetivamente; a pescada revelou teores de cádmio $2,1 \times 10^{-2}$ mg/kg (máximo legislado: $0,50 \times 10^{-1}$ mg/kg), sendo que para este alimento os teores de chumbo estavam abaixo do limite de quantificação do laboratório (0,01 mg/kg).

Foi feita a validação do método de determinação do sódio em vinhos por FAAS, nomeadamente ensaios relativos à análise da precisão, da exatidão, dos limites de quantificação, da linearidade, da gama de trabalho e da incerteza. Pelos ensaios realizados pode concluir-se que a precisão do método a nível da repetibilidade e da precisão intermédia é aceitável. Recorrendo a amostras de referência de vinhos, verificou-se que o método dá origem a resultados exatos. Os limites de quantificação, linearidade, gama de trabalho e incerteza são aceitáveis e estão de acordo com os parâmetros definidos pelo laboratório de MIA da *Silliker*.

O desenvolvimento desta tese em ambiente empresarial foi bastante enriquecedor, permitindo a aplicação de conhecimentos teóricos e práticos adquiridos ao longo da minha formação académica, experimentação de novas técnicas analíticas e a aquisição de experiência a nível profissional.

7. Bibliografia

- [1] - G. Fenaroli, in: T.E. Furina, N. Bellanca (Eds.), *Handbook of Flavour Ingredients*, Chemical Rubber Co, Cleaveland 1971.
- [2] - Baker SA, Millier-Ihli NJ. *Atomic Spectroscopy in Food Analysis. Encyclopedia of Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Ltd; 2006.
- [3] - Varzakas T, Arvanitoyannis I, Labropoulos A. *Food Additives and Contaminants. Advances in Food Biochemistry*. CRC Press; 2009. p. 409-56
- [4] - Nordberg GF, Sandstorm B, Becking G, Goyer RA. *Essentiality and Toxicity of Metals*. Sarkar B, editor. *Heavy Metals In The Environment*. Marcel Dekker, Inc; 2002. p. 1-33.
- [5] - Ortega R. *Analytical Methods for Heavy Metals in the Environment: Quantitative Determination, Speciation, and Microscopic Analysis*. In: Sarkar B, editor. *Heavy Metals In The Environment*. Marcel Dekker, Inc; 2002. p. 35-68.
- [6] – *Institut Mérieux* [Internet], http://www.institut-merieux.com/alliance_organigramme.php (consultada em 05/04/2015).
- [7] - *Silliker Portugal* [Internet], <http://www.merieuxnutrisciences.pt/pt/por/silliker/sobre-a-silliker/equipa> (consultado a 12/04/2015).
- [8] - *Silliker Portugal* [Internet], <http://www.merieuxnutrisciences.pt/pt/por/silliker> (consultado a 01/03/2015).
- [9] - *Silliker Portugal: Laboratório Físico-química* [Internet], <http://www.merieuxnutrisciences.pt/pt/por/silliker/os-nossos-servicos/quimica> (consultado em 02/03/2015)
- [10] - Jornal Oficial da União Europeia, Regulamento (UE), N.o 1169/2011 do parlamento europeu e do concelho, L304/18-63.
- [11] - Regulamento (CE) No 1881/2006 da Comissão de 19 de Dezembro de 2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. Jornal Oficial da União Europeia. 2006;364/5–24.

[12] - *Silliker* Portugal [Internet], <http://www.merieuxnutrisciences.pt/pt/por/servicos/seguranca-e-qualidade-alimentar/os-nossos-servicos/controlo-analitico-de-alimentos/analise-nutricional/562> (consultado em 02/03/2015).

[13] - *Silliker* Portugal [Internet], <http://www.merieuxnutrisciences.pt/pt/por/silliker/sobre-a-silliker/sobre-a-silliker/garantia-da-qualidade-dos-servicos-analiticos> (consultado em 05-703/2015)

[14] - *Mérieux Nutricienses* [Internet], <http://www.merieuxnutrisciences.pt/uploads/sfSympalBossMediaPlugin/document/2f547141481afe41e3ed9030a92e3a15a3e27846.pdf> (consultado em 02/03/2015)

[15] - Associação Portuguesa dos Nutricionistas [Internet], http://www.apn.org.pt/xFiles/scContentDeployer_pt/docs/Doc1270.pdf (consultado em 02/03/2015)

[16] - Regulamento (CE) N^o 1924/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho de 20 de Dezembro de 2006 relativo às alegações nutricionais de saúde sobre os alimentos.

[17] - Koedrith, P. and Seo, Y.R., *Advances in Carcinogenic Metal Toxicity and Potential Molecular Markers*. Int. J. Mol. Sci., 2011; p. 9576-9595

[18] - Fraga CG. *Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health*. Molecular Aspects of Medicine., 2005; p. 235-244.

[19] - Dinelli G, Marotti I, Bosi S, Gioia D Di, Biavati B, Catizone P. *Physiologically Bioactive Compounds of Functional Foods, Herbs, and Dietary Supplements. Advances in Food Biochemistry*. CRC Press, 2009; p. 239–289.

[20] - Enforma [Internet], <http://www.emforma.net/4428-a-importancia-do-calcio-no-nosso-organismo> (consultado em 03/05/2015)

[21] - FAO (Food and Agriculture Organization) [Internet], <http://www.fao.org/docrep/004/y2809e/y2809e0h.htm> (consultado em 03/05/2015)

[22] - Heaney R. *Bone as the Calcium Nutrient Reserve. Calcium in Human Health*. Humana Press; 2006. p. 7–12.

[23] - FAO (Food and Agriculture Organization) [Internet], <http://www.fao.org/docrep/004/y2809e/y2809e0h.htm#bm17.9> (consultado em 04/05/2015)

[24] - Enforma [Internet], <http://www.emforma.net/4428-a-importancia-do-calcio-no-nosso-organismo> (consultado em 04/05/2014)

[25] - FAO (Food and Agriculture Organization) [Internet], <http://www.fao.org/docrep/004/y2809e/y2809e0m.htm> (Consultado a 04/05/2015)

[26] - FIB (Food Ingredients Brasil) [Internet], <http://www.revista-fi.com/materias/52.pdf> (Consultado a 04/05/2015)

[27] - OMS (Organização Mundial de Saúde) [Internet], http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77986/1/9789241504829_eng.pdf?ua=1&ua=1 (consultado em 21/04/2015)

[28] – Quintas A., Freire A.P. Halpern M. J., *Bioquímica-organização molecular da vida*; 2008 p.484-485

[26] – Higdon J, Drake VJ. *Sodium Chloride. Evidence-Based Approach to Vitamins and Minerals: Health Benefits and Intake Recommendations*. Thieme; 2003. p. 190 – 196.

[30] –Webster JL, Dunford EK, Neal BC. *A systematic survey of the sodium contents of processed foods*. The American journal of clinical nutrition. 2010; p. 413 – 420.

[31] –Ni Mhurchu C, Capelin C, Dunford EK, Webster JL, Neal BC, Jebb SA. *Sodium content of processed foods in the United Kingdom: analysis of 44,000 foods purchased by 21,000 households*. The American journal of clinical nutrition. 2011; 594– 600.

[32] - OMS (Organização Mundial de Saúde) [Internet], <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs393/en/> (consultado em 16/03/2015).

[33] - Holbrook JT, Patterson KY, Bodner JE. *Sodium and potassium intake and balance in adults consuming self-selected diets*. American Journal of Clinical Nutrition. 1984; 786– 93.

[34] - OMS (Organização Mundial de Saúde) [Internet], http://www.who.int/mediacentre/news/notes/2013/salt_potassium_20130131/en/ (consultado em 21/04/2015).

[35] - Metals and detoxification – [Internet], <http://drlwilson.com/articles/TOXIC%20METALS.htm> (consultado em 24/06/2015).

[36] - Fernandes ASG, Caneiras C, Oliveira N, Costa J, Cabral MF, Castro M. *Cádmio: Fontes de exposição e efeitos tóxicos para o homem*. Autoridade de Segurança Alimentar e Económica [Internet]. 2011; disponível em: <http://www.asae.pt>

[37] - Camargo, M.M.A, Batistuzzo, J.A.O. *Fundamentos de Toxicologia*. Editora Atheneu, 2008; p. 677.

[38] - Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), *Toxicological Profile for Cadmium*. Department of Health and Human Services, USA, 1999

[39] - Hayes A. W. *Principles and Methods of Toxicology*, 4^a Ed. Taylor and Francis, USA, 2001, pp 59-61, 665-667, 853-860.

[40] - Handbook of Experimental Pharmacology - [Internet], http://download.springer.com/static/pdf/531/bfm%253A978-3-642-70856-5%252F1.pdf?originUrl=http%3A%2F%2Flink.springer.com%2Fbook%2Fbfm%3A978-3-642-70856-5%2F1&token2=exp=1442505625~acl=%2Fstatic%2Fpdf%2F531%2Fbfm%25253A978-3-642-70856-5%252F1.pdf%3ForiginUrl%3Dhttp%253A%252F%252Flink.springer.com%252Fbook%252Fbfm%253A978-3-642-70856-5%252F1*~hmac=c14a0e4550948c9de7a3f8bce0144e7f5579202de12190432557040ea0f1bfc5 (consultado em 01/07/2015)

[41] - Midio A.F., Martins D.I. *Toxicologia de Alimentos*. Livraria Varela, São Paulo, 2000; p. 111-113, 123-127

[42] - Klassen, Curtis D. Casarett and Doull's, *Toxicology -The Basic Science of Poisons*. McGraw-Hill, 2001; p. 822-826

[43] – Regulamento (UE) No 488/2014 da Comissão de 12 de maio de 2014 que altera o Regulamento (CE) no 1881/2006 no que diz respeito aos teores máximos de cádmio nos géneros alimentícios. Jornal Oficial da União Europeia. 2014; L 138/75 – 79.

[44] - EPA (Agência de Proteção Ambiental) – [Internet], http://www.atsdr.cdc.gov/toxfaqs/ToxFAQS_Foreign_Language_PDFs/tfacts5_portuguese.pdf (consultado em 24/06/2015)

[45] - Wuana RA, Okieimen FE. *Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation*. ISRN Ecology. 2011; p. 1–20.

[46] - LEVIN, R. et al., *Lead exposures in U.S. children. Implications for prevention*. Environmental Health Perspectives, 2008.

[47] - Reilly C. *Pollutants in Food - Metals and Metalloids. Mineral Components in Foods*. CRC Press, 2006; p. 363–388

[48] - Bruening K, Kemp F, Simone N, Holding Y, Louria D, Bogden J. *Dietary calcium intakes of urban children at risk of lead poisoning*. Environmental health perspect. 1999; p. 431-435

[49] - Moreira FR, Moreira JC. *Os efeitos do chumbo sobre o organismo humano e seu significado para a saúde*. Revista Panamericana de Salud Pública. 2004; 119–129.

[50] - Rocha, A., *Cádmio, Chumbo, Mercúrio – A problemática destes metais pesados na Saúde Pública?.*, Faculdade de Ciências da Nutrição – Universidade do Porto. 2008/2009

[51] - Pagliuca A, Mufti GJ, Baldwin D, Lestas AN, Wallis RM, Bellingham AJ. *Lead poisoning: clinical, biochemical, and haematological aspects of a recent outbreak*. Journal of clinical pathology. 1990. p. 277–281.

[52] - Omaye ST. *Residues in Foods. Food and Nutritional Toxicology*. CRC Press; 2004. p. 247–252.

[53] - Sádecká J, Polonský J. *Determination of inorganic ions in food and beverages by capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography A, 1999; p. 401–417.

- [54] - Malinkin AD, Bessonov VV, Shumakova AA, Arianova EA, Prokof'eva VI. *Determination of major metal cations in juices and nectars by capillary zone electrophoresis*. Pub Med, 2014; p.74-79.
- [55] - Feng H, Wang T, Fong Yau Li S. *Sensitive determination of trace-metal elements in tea with capillary electrophoresis by using chelating agent 4-(2-pyridylazo) resorcinol (PAR)*. Food Chemistry. 2003 p. 607–611.
- [56] - Eletroforese Capilar: conceitos básicos - [Internet], <http://www.scientiachromatographica.com/files/v4n4/v4n4a05.pdf> (consultado em 10/06/2015).
- [57] - Fredrikson M, Carlsson NG, Almgren A, Sandberg AS. *Simultaneous and sensitive analysis of Cu, Ni, Zn, Co, Mn, and Fe in food and biological samples by ion chromatography*. J Agric Food Chem. 2002; p. 59-65
- [58] - Buldini PL, Cavalli S, Mevoli A, Sharma JL. *Ion chromatographic and voltammetric determination of heavy and transition metals in honey*. Food Chemistry. 2001; p.487 – 495.
- [59] - Sancho D, Debán L, Barbosa F, Pardo R, Vega M. *Determination of mercury in refined beet sugar by anodic stripping voltammetry without sample pretreatment*. Food Chemistry. 2001; p. 527 – 531.
- [60] - Satzger RD, Kuennen RW, Fricke FL. *Determination of lead in bonemeal by differential pulse anodic stripping voltammetry using a hydrochloric acid solubilization*. Journal- Association of Official Analytical Chemists. 1983; p. 985 - 988.
- [61] - Sancho D, Vega M, Deban L, Pardo R, Gonzales G. *Determination of Zinc, Cadmium and Lead in Untreated Sugar Samples by Anodic Stripping Voltammetry*. Analyst. The Royal Society of Chemistry; 1997; p. 727 – 730.
- [62] - Sancho, D; Deban, L; Barbosa, F; Pardo, R; Vega, M. *Determination of cooper and arsenic in refined beet sugar by stripping voltammetry without sample pretreatment*. The analyst. 1998; p. 143-147.
- [63] - Locatelli C, Torsi G. *Simultaneous square wave anodic stripping voltammetric determination of Cr, Pb, Sn, Sb, Cu, Zn in presence of reciprocal interference: application to meal matrices*. Microchemical Journal. 2004; p. 175 – 180.

- [64] - Gao Z, Siow KS. *Determination of trace amounts of iron by catalytic-adsorptive stripping voltammetry*. *Talanta*, 1996; p. 727 - 733.
- [65] - Guo Z, Feng F, Hou Y, Jaffrezic-Renault N. *Quantitative determination of zinc in milkvetch by anodic stripping voltammetry with bismuth film electrodes*. *Talanta*, 2005; p. 1052 - 1055.
- [66] - Abbasi S, Khani H, Tabaraki R. *Determination of ultra trace levels of copper in food samples by a highly sensitive adsorptive stripping voltammetric method*. *Food Chemistry*, 2010; 507–512.
- [67] - Sancho D, Debán L, Campos I, Pardo R, Vega M. *Determination of nickel and cobalt in refined beet sugar by adsorptive cathodic stripping voltammetry without sample pretreatment*. *Food Chemistry*, 2000; 139 – 145.
- [68] - Abu Zuhri, A.Z., Voelter, W. *Applications of adsorptive stripping voltammetry for the trace analysis of metals, pharmaceuticals and biomolecules*. *J. Anal. Chem.*, 1998; p. 1-9
- [69] - Mir-Marqués A., Garrigues S., M. L.,Guardia M. *Direct determination of minerals in human diets by infrared spectroscopy and X-ray fluorescence*. *Microchemical Journal*. 2014; 156 – 163.
- [70] - Lucas A, Andueza D, Rock E, Martin B. *Prediction of dry matter, fat, pH, vitamins, minerals, carotenoids, total antioxidant capacity, and color in fresh and freeze-dried cheeses by visible-near-infrared reflectance spectroscopy*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008; p. 6801 – 6808.
- [71] - González-Martín I, González-Pérez C, Hernández-Méndez J, Alvarez-García N. *Mineral analysis (Fe, Zn, Ca, Na, K) of fresh Iberian pork loin by near infrared reflectance spectrometry: Determination of Fe, Na and K with a remote fibre-optic reflectance probe*. *Analytica Chimica Acta*, 2002; p. 293 – 301.
- [72] - Schmitt S, Garrigues S, de la Guardia M. *Determination of the Mineral Composition of Foods by Infrared Spectroscopy: A Review of a Green Alternative*. *Analytical Chemistry*. 2014; p. 186 – 197.
- [73] - Douglas A. Skoog, Donald M. West, F. James Holler SRC. *Atomic Spectroscopy. Fundamentals of Analytical Chemistry*. 9th ed. Brooks/Cole, Cengage Learning, 2014; p. 773-801.

- [74] - Capar S, Szefer P. *Determination and Speciation of Trace Elements in Foods. Methods of Analysis of Food Components and Additives*. CRC Press; 2005; p. 111 – 158.
- [75] – Slavin, W. – *A comparison of atomic spectroscopic analytical techniques*. Spectroscopy International, 1992; p. 22-27.
- [76] – García R, Báez AP. *Atomic Absorption Spectrometry (AAS)*. InTech; 2012; p. 1 – 12
- [77] – D. A. Skoog, F. J. Holler, T. a Niemen; *Princípios de Análise Instrumental*, 5ª Ed. Bookman, Porto Alegre 1998. P 84-89.
- [78] –Biziuk M, Kuczynska J. *Mineral Components in Food - Analytical Implications*. CRC Press, 2006; p. 1–31.
- [79] - José A. C. Broekaert, *Analytical Atomic Spectrometry with Flames and Plasmas*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. 2002; p. 148 - 191.
- [80] – Szymczycha-Madeja A, Welna M, Pohl P.; *Simplified multi-element analysis of ground and instant coffees by ICP-OES and FAAS*; Pub Med, 2015; p. 1488-1500.
- [81] - Lauri H. J. Lajunen,P. Perämäki, *Spectrochemical Analysis by Atomic Absorption and Emission*. Royal Society of Chemistry, 2004; p.109 - 149
- [82] - Holcombe JA. *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*. Encyclopedia of Analytical Chemistry. John Wiley & Sons, Ltd; 2006.
- [83] -Freschi GPG, Dakuzaku CS, Gomes Neto JA, Moraes M.; *Espectrometria de absorção atômica multielementar simultânea com atomização eletrotérmica em forno de grafite - uma revisão da técnica e aplicações*. Eclética Química. 2000; p. 213 – 226.
- [84] - M.A. Belarra, M. Resano F. Vanhaecke, L. Moens, *Direct solid sampling with electrothermal vaporization/atomization: what for and how?*; Trends in Analytical Chemistry, 2002; p. 828 – 839.
- [85] - Luis-González G, Rubio C, Gutiérrez Á, González-Weller D, Revert C, Hardisson A.; *Essential and toxic metals in taros (Colocasia esculenta) cultivated in the Canary Islands (Spain): evaluation of content and estimate of daily intake*. Environmental Monitoring and Assessment; Springer, 2015; p. 187 - 4138

[86] - Andrade Korn M das G, da Boa Morte ES, Batista dos Santos DCM, Castro JT, Barbosa JTP, Teixeira AP, *Sample Preparation for the Determination of Metals in Food Samples Using Spectroanalytical Methods—A Review*. Applied Spectroscopy Reviews. 2008. p. 67–92.

[87] – KIRA C. S. *Estudo da composição mineral e dos elementos traço essenciais em amostras de leite e produtos lácteos por espectrometria de emissão atômica com plasma induzido e análise por atização com neutrons*; Instituto de pesquisas energéticas e nucleares - Autarquia associada à Universidade de São Paulo

[88] - R. ANDERSON, *Sample Pretreatment and Separation*. Analytical Chemistry. Open Learning. Chichester: John Wiley, 1991. p. 632.

[89] - Jorhem L. *Determination of metals in foods by atomic absorption spectrometry after dry ashing: NMKL1 collaborative study*. Journal Of Aoac International. 2000; p. 1204 – 1211.

[90] - Preer JR, Stephens BR, Bland CW; *Sample preparation in determination of lead in garden vegetables by flame atomic absorption spectrophotometry*; J Assoc Off Anal Chem. 1982; p. 1010 – 1015.

[91] - Akinyele I.O., Shokunbi O.S. *Concentrations of Mn, Fe, Cu, Zn, Cr, Cd, Pb, Ni in selected Nigerian tubers, legumes and cereals and estimates of the adult daily intakes*. Food Chem., 2015; p. 702 – 708.

[92] - T.T.Gorsuch. *The Destruction of Organic Matter*. Oxford, Pergamon, 1970, p.151

[93] - G.V. Iyengar & B. Sansoni. *Sample Preparation of Biological Material for Trace Element Analysis*. Vienna, 1980, p.28.

[94] - Wladiana O. Matos, Eveline A. Menezes, Mário H. Gonzalez, Letícia M. Costa, Lilian C. Trevizan, Ana Rita A. Nogueira; *Partial microwave-assisted wet digestion of animal tissue using a baby-bottle sterilizer for analyte determination by inductively coupled plasma optical emission spectrometry*; Spectrochimica Acta Part B 64 (2009) p.615–618.

[95] - Somenath Mitra; *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*; John Wiley & Sons., 2003; p. 230-237

- [96] - He XM, Wang M, Wang XD, Xue AF, Sheng-Qing L, Chen H.; *Determination of lead and cadmium in rapeseed and rapeseed meal with microwave digestion by graphite furnace atomic absorption spectrometry*; *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi.*, 2007; p. 2353 - 2356.
- [97] - Chekri R, Noël L, Vastel C, Millour S, Kadar A, Guérin T; *Determination of calcium, magnesium, sodium, and potassium in foodstuffs by using a microsampling flameatomic absorption spectrometric method after closed-vessel microwave digestion: method validation*; *J AOAC Int.* 2010; 1888 – 1896.
- [98] - EN 14082:2003: Foodstuffs - Determination of trace elements - Determination of lead, cadmium. Zinc, copper, iron and chromium by atomic absorption spectrometry (AAS) after dry ashing.
- [99] - RELACRE. Guia 3 - Validação de Resultados em Laboratórios Químicos.
- [100] - NIH – National Institutes of Health [Internet] - <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Calcium-HealthProfessional/> (consultado em 11/08/2015).
- [101] - NIH – National Institutes of Health [Internet] - <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Zinc-HealthProfessional/> (consultado em 11/08/2015).
- [102] – WHO – World Health Organization [Internet] - http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77986/1/9789241504829_eng.pdf?ua=1&ua=1 (consultado em 11/08/2015).
- [103] – WHO – World Health Organization [Internet] - http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77985/1/9789241504836_eng.pdf?ua=1&ua=1 (consultado em 11/08/2015).
- [104] - RELACRE. Guia 13 - Validação de Métodos Internos de ensaio em Análise Química.
- [105] - Huber L. *Validation and Qualification in Analytical Laboratories*. Interpharm Press, East Englewood, CO, USA. 1998.
- [106] - J. C. Miller e J. N. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, Ellis Horwood, 2000.

[107] - Instituto Português da Qualidade (IPQ), Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro). Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM) – Conceitos fundamentais e gerais e termos associados. 2012.

8. Anexos

Anexo A: Cálculos e incertezas

Exemplo 1: Cálculo dos limiares analíticos

Utilizando como exemplo a curva de calibração do cálcio (gama baixa):

- ✓ $y = (0,3634 \pm 0,0033)x + (0,0418 \pm 0,0017)$
- ✓ Desvio padrão residual da curva de calibração: $S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_1 (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} = 0,0024$
- ✓ Limite de detecção a partir da reta: $LD = \frac{3,3 S_{y/x}}{declive} = 0,0217 \text{ mg/L}$
- ✓ Limite de quantificação a partir da reta: $LQ = \frac{10 S_{y/x}}{declive} = 0,0660 \text{ mg/L}$
- ✓ Limite de detecção do método, utilizando a fórmula de cálculo das amostras (equação 3): $LD = \frac{c_i \times v_i \times D}{m_i} = \frac{0,0218 \times 100 \times 1}{10} = 0,2170 \text{ mg/kg}$
- ✓ Limite de quantificação do método, utilizando a fórmula de cálculo das amostras (equação 3): $LQ = \frac{c_i \times v_i \times D}{m_i} = \frac{0,0660 \times 100 \times 1}{10} = 0,6600 \text{ mg/kg}$
- ✓ Limite de quantificação definido pelo laboratório, utilizando a fórmula de cálculo das amostras (equação 3) e o padrão de quantificação: $LQ = \frac{c_i \times v_i \times D}{m_i} = \frac{0,1 \times 100 \times 1}{10} = 1,0 \text{ mg/kg}$

Exemplo 2: Cálculo do erro relativo dos padrões de controle

Utilizando como exemplo o padrão de 0,1 mg/L de cálcio temos:

- ✓ Concentração de referência: 0,1 mg/L
- ✓ Concentração obtida: 0,10959 mg/L
- ✓ Erro relativo = $\frac{|Concentração \text{ de referência} - Concentração \text{ Obtida}|}{Concentração \text{ de referência}} \times 100 = 9,6 \%$

Exemplo 3: Cálculo do desvio relativo dos duplicados

Utilizando como exemplo a determinação de cálcio na amostra *Bolacha* temos:

- ✓ Concentração do duplicado A: 2627,8 mg/kg

- ✓ Concentração do duplicado B: 2456,9 mg/kg
- ✓ Média dos duplicados: 2542,4 mg/kg
- ✓ Desvio relativo = $\frac{|Concentração\ de\ A - Concentração\ de\ B|}{Média} \times 100 = 6,7\ %$

Exemplo 4: Cálculo do Z-score

Utilizando como exemplo a determinação de cádmio na amostra Soya Flour (FAPAS), utilizada previamente num circuito interlaboratorial, temos:

- ✓ Valor obtido (média dos duplicados) = 488 µg/kg
- ✓ Valor de referência (fornecido pela entidade organizadora do ensaio interlaboratorial) = 457 µg/kg
- ✓ S (desvio definido pela entidade organizadora do ensaio interlaboratorial) = 82,3
- ✓ Z-score = $\frac{V_{obtido} - V_{referência}}{S} = \frac{488 - 457}{82,3} = 0,377$

Exemplo 5: Cálculo da incerteza das amostras

Utilizando como exemplo a determinação de cálcio na amostra DPC A temos:

- ✓ Concentração da amostra:

$$C_{amostra} = \frac{c_i \times v_i \times D}{m_i} = \frac{1,6250 \frac{mg}{L} \times 50,00mL \times 250,00}{5,0639 g} = 4011,23 mg/kg$$

- ✓ Fontes de incerteza da amostra:

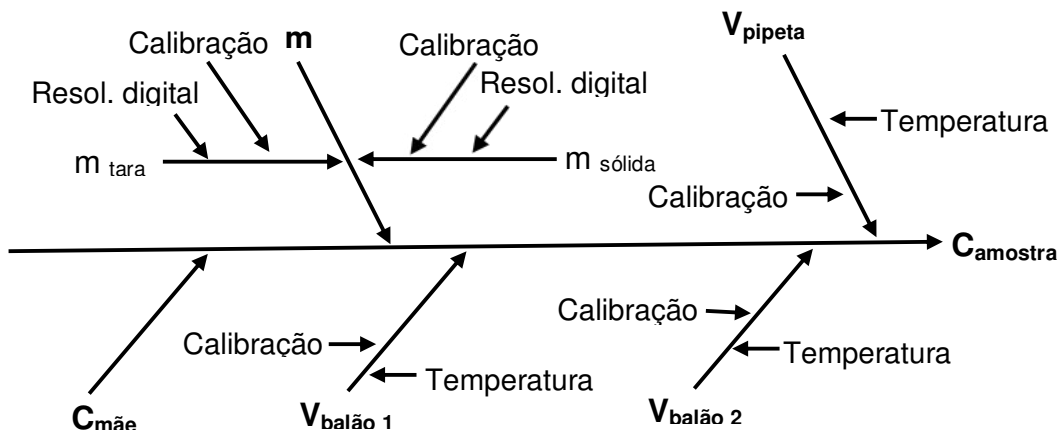


Figura XIII - Diagrama de "causa-efeito" para amostra DPC A.

Tabela XIV - Fontes de incerteza da amostra DPC A.

Fonte de incerteza	Valor de x	u(x)	u(x)/x
Concentração inicial (mg/L)	1,6250	0,11759	0,0723
Massa da amostra (g)	5,0639	$1,0 \times 10^{-4}$	$1,97 \times 10^{-5}$
Volume do balão volumétrico 1 (mL)	50,00	0,06	0,012
Volume da pipeta volumétrica (mL)	1,00	$8,0 \times 10^{-3}$	$8,0 \times 10^{-3}$
Volume do balão volumétrico 2 (mL)	250,00	0,15	$3,0 \times 10^{-3}$

- ✓ A incerteza combinada da amostra foi calculada a partir da seguinte fórmula:

$$u_{C_{amostra}} = C_{amostra} \times \sqrt{\left(\frac{u_{C_i}}{C_i}\right)^2 + \left(\frac{u_{massa}}{massa}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_{pipeta}}}{V_{pipeta}}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_{balão}}}{V_{balão}}\right)^2}$$

Tabela XV - Incerteza combinada e expandida da amostra DPC A.

Amostra	Concentração (mg/kg)	Incerteza combinada (mg/kg)	Fator de expansão	Incerteza expandida (mg/kg)
DPC A	4011,23	292,082	2	584,164

Exemplo 6: Validação do método de determinação do sódio em vinhos

Usando como exemplo a amostra *Red Wine*:

- ✓ Cálculo da variância de repetibilidade:

$$S_{ri}^2 = \frac{(n_{wi}-1) \cdot S_{wi}^2}{(n_{wi}-1)} = \frac{9 \cdot (0,258)^2}{9} = 0,067 \text{ mg/kg}$$

- ✓ Cálculo do limite de repetibilidade:

$$r = 2,8 \sqrt{S_{ri}^2} = 2,8 \sqrt{0,067} = 0,722 \text{ mg/kg}$$

- ✓ Cálculo do coeficiente de variação:

$$CV \% = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 = \frac{0,067}{11,480} \times 100 = 0,58 \%$$

- ✓ Cálculo do teste de Cochran:

Maior variância: $s_{max}^2 = 1,512$

Somatório de todas as variâncias: $\sum_{i=1}^k s_i^2 = 1,835$

$$C_{calculado} = \frac{s_{max}^2}{\sum_{i=1}^k s_i^2} = \frac{1,512}{1,835} = 0,824$$

- ✓ Cálculo do teste de Grubbs:

Teste ao valor mínimo:

Valor mínimo: 11,01 mg/kg

Desvio padrão dos valores experimentais: $s_x = 0,258$

Média dos valores experimentais: 11,486 mg/kg

$$G = \frac{\max |x_i - \bar{x}|}{s_x} = \frac{x_? - \bar{x}}{s_x} = \frac{11,01 - 11,486}{0,258} = 1,846$$

Teste ao valor máximo:

Valor máximo: 11,78 mg/kg

Desvio padrão dos valores experimentais: $s_x = 0,258$

Média dos valores experimentais: 11,486 mg/kg

$$G = \frac{\max |x_i - \bar{x}|}{s_x} = \frac{x_? - \bar{x}}{s_x} = \frac{11,78 - 11,486}{0,258} = 1,140$$

- ✓ Cálculo do desvio padrão da precisão intermédia:

t=5

$$\sum_{j=1}^t (y_{j1} - y_{j2})^2 = 1,59 \text{ mg/kg}$$

$$S_i = \sqrt{\frac{1}{2t} \sum_{j=1}^t (y_{j1} - y_{j2})^2} = \sqrt{\frac{1}{10} \cdot 1,59} = 0,40 \text{ mg/kg}$$

- ✓ Cálculo do limite da precisão intermédia:

Média das médias dos duplicados: 13,07 mg/kg

$$r_i = \frac{s_i \times 2,8}{\bar{x}} \times 100 = \frac{0,45 \times 2,8}{13,07} \times 100 = 8,5 \%$$

- ✓ Cálculo da precisão intermédia relativa:

$$\text{Precisão intermédia relativa} = \frac{r_i}{2,8} = \frac{8,5}{2,8} = 3,08 \text{ mg/kg}$$

- ✓ Cálculo da precisão intermédia absoluta:

$$\bar{x}_{\text{repetibilidade}} = 11,58 \text{ mg/kg}$$

$$\text{Precisão intermédia absoluta} = \frac{\text{Precisão intermédia relativa} \times \bar{x}_{\text{repetibilidade}}}{100} = 0,34 \text{ mg/kg}$$

- ✓ Cálculo da incerteza combinada:

$$u_{\text{combinada}} = \sqrt{u_{\text{certificado absoluta}}^2 + \left(\frac{S_i}{\sqrt{2}}\right)^2} = \sqrt{1^2 + \left(\frac{0,398748}{\sqrt{2}}\right)^2} = 1,038990$$

- ✓ Cálculo da incerteza expandida:

Fator de expansão: 2

$$u_{\text{expandida}} = u_{\text{combinada}} \times 2 = 2,1$$

- ✓ Cálculo da incerteza expandida relativa:

$$u_{\text{expandida relativa}} = \frac{u_{\text{expandida}} \times 100}{\bar{x}_{\text{repetibilidade}}} = \frac{2,1 \times 100}{11,58} = 17,9$$