

Dissertação para o Mestrado Integrado em Bioengenharia

Especialização em Engenharia Biológica



***DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA
ALTERNATIVA POR FLUORESCÊNCIA DE
RAIOS-X PARA A QUANTIFICAÇÃO DE
TEORES DE CÁLCIO, FERRO E ZINCO EM
PRÉ-MISTURAS***

Por João Gonçalo Gameiro Torres

Desenvolvida para a disciplina de Dissertação

Realizada na fábrica da Nestlé S.A de Avanca

Orientador: Eng.º Hugo Costa

Coorientador: Dr. Manuel Simões

Setembro, 2016

“The first step is to establish that something is possible; then probability will occur.”

Elon Musk

Agradecimentos

Gostaria de agradecer às seguintes entidades, pois sem elas era impossível a realização desta dissertação.

À minha família pelo apoio constante em todas as fases do desenvolvimento desta dissertação e no meu percurso académico. À Andreia Paço e restante pessoal do laboratório Físico-Químico da Fábrica da Nestlé de Avanca pela boa disposição constante e ajuda tremenda na minha primeira experiência a nível empresarial.

Queria também agradecer ao Eng.º Hugo Costa pela disponibilidade e orientação para o desenvolvimento desta dissertação. À Dra. Fátima Sodré, chefe do Departamento de Garantia de Qualidade, pela simpatia e valorização do meu trabalho. A todo o pessoal do Departamento de Garantia de Qualidade pelo esforço constante para a minha integração e bem-estar. Muito Obrigado!

Abstract

Infant flours are foods destined for infants above 6 months of age, having the objective to suppress the high nutritional needs that are characteristic of this age range. For this reason, frequently there is an intentional increase on their content in micronutrients, by addition of vitamin and mineral premixes in a process known as fortification. The implementation of alternative analytical methods like X-ray Fluorescence (XRF) Spectrometry at the production line allows that, with high speed and precision, minerals like calcium, iron and zinc can be quantified in premixes. This method yields a considerably better infant flour fortification process control.

In this work, there were developed seven calibration models by XRF Spectrometry for the quantification of calcium, iron and zinc in premixes 75, 76 and 98, being Flame Atomic Absorption Spectrometry (FAAS) used as analytical reference method: model Ca75 with a R^2 of 0,988 and a Standard Error of Calibration (SEC) of 0,406%, model Ca7698 with a R^2 of 0,929 and SEC of 1,104%, model Fe75 with a R^2 of 0,976 and SEC of 0,053%, model Fe7698 with a R^2 of 0,933 and SEC of 0,174%, model Zn75 with a R^2 of 0,967 and SEC of 10,711 mg/100g, model Zn76 with a R^2 of 0,911 and SEC of 2,563 mg/100g and finally model Zn98 with a R^2 of 0,884 and SEC of 39,434 mg/100g.

All seven created models are in conformity with all internal seven acceptance criteria. Moreover, models revealed showed a good performance in quantification of calcium, iron and zinc on PMs 75, 76 and 98, existing a less than 9,5% relative deviation in the great majority of readings, being the prediction of iron on PM 98 the great exception. Regarding repeatability, it was found a direct relation between its indicators and the concentration ranges one is working on. The lower the concentration, the worse are the repeatability parameters between replicates of a sample in X-ray Spectrometry.

Key words: XRF Spectrometry; FAAS; Premixes; Fortification; Infant Flours; Quality Control.

Resumo

Farinhas infantis são alimentos que se destinam a crianças a partir dos 6 meses de idade, tendo o objetivo de suprir as elevadas necessidades nutricionais que são características desta faixa etária. Para isto, é frequente que exista um aumento propositado do seu teor em micronutrientes por adição de pré-misturas de vitaminas e minerais, num processo que é denominado de fortificação. A implementação de métodos alternativos de análise como a espectrometria de XRF na linha de produção permite que, com elevada rapidez e precisão, se determinem teores de minerais como cálcio, ferro e zinco em pré-misturas. Isto permite um melhor controlo no processo de fortificação das farinhas infantis.

Foram desenvolvidos sete modelos de calibração por espectrometria de Fluorescência de Raios-X (XRF – *X-ray Fluorescence*), para a quantificação do teor de cálcio, ferro e zinco em pré-misturas de diferente composição (75, 76 e 98), tendo sido utilizado como método analítico de referência a Espectrometria de Absorção Atômica com Chama: o modelo Ca75 com um R^2 de 0,988 e um Erro padrão da Calibração – *Standard Error of Calibration* (SEC) de 0,406%, o modelo Ca7698 um R^2 de 0,929 e um SEC de 1,104%, o modelo Fe75 com um R^2 de 0,976 e um SEC de 0,053%, o modelo Fe7698 com um R^2 de 0,933 e um SEC de 0,174%, o modelo Zn75 com um R^2 de 0,967 e um SEC de 10,711 mg/100g, o modelo Zn76 com um R^2 de 0,911 e um SEC de 2,563 mg/100g e o modelo Zn98 com um R^2 de 0,884 e um SEC de 39,434 mg/100g.

Os sete modelos criados estão em conformidade com os sete critérios de aceitação internos. Além disto, os modelos revelaram uma boa performance no geral para a previsão de teores de cálcio, ferro e zinco em pré-misturas 75, 76 e 98, existindo um desvio relativo inferior a 9,5% na grande maioria das leituras, excetuando a previsão da concentração de ferro em amostras de pré-mistura 98. Em relação à repetibilidade, entre replicados das amostras por espectrometria de XRF, constatou-se que esta tem uma relação direta com as gamas de concentração em que se trabalha, concluindo-se que quanto menor é a concentração a quantificar, pior é a repetibilidade alcançada.

Palavras-chave: Espectrometria de XRF; Espectrometria de Absorção Atômica com Chama; Pré-misturas; Fortificação; Farinhas Infantis; Garantia de Qualidade.

Declaração

Declaro, sob compromisso de honra, que este trabalho é original e que todas as contribuições não originais foram devidamente referenciadas com identificação da fonte.

Índice

| | |
|--|------|
| Agradecimentos | i |
| Abstract | iii |
| Resumo..... | v |
| Declaração..... | vii |
| Índice..... | ix |
| Lista de Figuras..... | xiii |
| Lista de Tabelas | xvii |
| Glossário..... | xix |
| Lista de Siglas | xix |
| 1. Objetivos | 1 |
| 2. Introdução..... | 2 |
| 2.1 Nutrição infantil | 2 |
| 2.1.1 Importância dos micronutrientes..... | 3 |
| 2.1.2 Deficiência em micronutrientes..... | 3 |
| 2.1.3 A fortificação de alimentos como arma de combate à má nutrição..... | 4 |
| 2.2 Nestlé: estratégia global e nacional | 5 |
| 2.2.1 Fortificação de farinhas infantis na fábrica da Nestlé de Avanca | 6 |
| 2.2.2 Política da Qualidade na Nestlé | 8 |
| 2.2.3 Sistema de Gestão de Qualidade da Nestlé | 9 |
| 2.2.4 Garantia de Qualidade na fábrica da Nestlé de Avanca..... | 10 |
| 3. Determinação de cálcio, ferro e zinco em PM | 12 |
| 3.1 Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (FAAS)..... | 12 |
| 3.1.1 Fontes de radiação ótica | 12 |
| 3.1.2 Espelhos..... | 13 |
| 3.1.3 Modulador..... | 14 |
| 3.1.4 Atomizador..... | 14 |
| 3.1.5 Monocromador e Fendas | 17 |
| 3.1.6 Detetor e Amplificador..... | 18 |
| 3.1.7 Interferências em FAAS..... | 20 |
| 3.2 Espectrometria por Fluorescência de Raios-X..... | 22 |
| 3.2.1 Raios-X e a sua interação com a matéria | 22 |
| 3.2.2 Produção de radiação fluorescente característica..... | 23 |
| 3.2.3 Absorção de radiação..... | 25 |
| 3.2.4 Configuração ótica do EDXRF | 25 |

| | |
|---|----|
| 3.2.5 Tubos de raios-X..... | 27 |
| 3.2.6 Alvos secundários..... | 28 |
| 3.2.7 Detetor e Analisador Multicanal | 28 |
| 3.2.8 Picos de escape e picos <i>pile-up</i> | 29 |
| 3.2.9 Filtros..... | 29 |
| 3.2.10 Cristais de difração e Colimadores..... | 30 |
| 3.2.11 Máscaras e <i>Spinner</i> | 30 |
| 4. Materiais e Métodos | 32 |
| 4.1 Seleção de amostras..... | 32 |
| Preparação de amostras experimentais..... | 32 |
| 4.2 Procedimento experimental para a quantificação de cálcio, ferro e zinco em PMs por FAAS | 33 |
| 4.2.1 Reagentes usados e soluções preparadas..... | 33 |
| 4.2.2 Preparação das amostras | 33 |
| 4.2.3 Análise das amostras..... | 35 |
| 4.3 Procedimento experimental para a quantificação de cálcio, ferro e zinco em PMs por Espectrometria de XRF | 36 |
| 4.3.1 Preparação dos copos amostrais | 36 |
| Condições de operação do equipamento e leituras | 36 |
| 5. Resultados e Discussão | 38 |
| 5.1 Curvas de calibração para a determinação de cálcio em pré-misturas (por espectrometria de XRF) | 39 |
| 5.2 Curvas de calibração para a determinação de ferro em PMs (por espectrometria de XRF) | 41 |
| 5.3 Curvas de calibração para a determinação de zinco em PMs (por espectrometria de XRF) | 44 |
| 5.4 Análise à performance dos modelos de calibração | 48 |
| 5.5 Análise à precisão do método alternativo – repetibilidade de todas as leituras de amostras usadas na construção modelos calibração..... | 51 |
| Conclusões | 54 |
| Objetivos Realizados | 54 |
| Apreciação Final e Trabalho Futuro | 54 |
| Bibliografia | 56 |
| Anexos..... | 60 |
| A.1 Curvas de calibração de Cálcio (com todos os replicados) | 60 |
| A.2 Curvas de calibração de Ferro (com todos os replicados) | 63 |
| A.3 Curvas de calibração de Zinco (com todos os replicados) | 66 |

| | |
|---|----|
| B.1 Análise à repetibilidade (exemplificada com o modelo Ca75)..... | 70 |
|---|----|

Lista de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Diagrama dos princípios de Qualidade na Nestlé, tendo como objetivo central a confiança dos consumidores e clientes (adaptado de [19]). | 9 |
| Figura 2 - Esquema dos 5 elementos que compõem o SGQ da Nestlé.[20] | 10 |
| Figura 3 – Ilustração de uma LCO (adaptado de [25]). O <i>Getter</i> é um substrato presente em alguns modelos de LCO para absorver gases residuais contaminantes.[26] | 13 |
| Figura 4 – Modos de transmissão e refletivo do modulador em sistemas de FAAS.(adaptado de [23]) | 14 |
| Figura 5 – Esquema de um atomizador. (adaptado de [27]) | 14 |
| Figura 6 – Tubo de Venturi.[28] | 15 |
| Figura 7 – Sistema de grandeamento num Monocromador de Czerney-Turner. (adaptado de [23]) | 17 |
| Figura 8 – Ilustração de um Fototubo. (adaptado de [23]) | 18 |
| Figura 9 – Funcionamento de um sistema de feixe duplo em FAAS. a) quando o modulador está em modo de reflexão, direciona o feixe luminoso para a amostra; b) quando o modulador está em modo de transmissão não interage com o feixe e este vai para o monocromador sem interagir com a amostra. (adaptado de [23]) | 19 |
| Figura 10 – Esquema de funcionamento da correção de “background” por lâmpada de deutério. (adaptado de [32]) | 20 |
| Figura 11 – Interações dos raios-X com matéria. (adaptado de [33]) | 23 |
| Figura 12 – Esquema da produção de radiação fluorescente característica. (adaptado de [33]) | 23 |
| Figura 13 – Coeficiente de absorção mássica μ (cm ² /g) em função da Energia (KeV) de um fóton de raio-X. (adaptado de [33]) | 24 |
| Figura 14 – Esquema da produção de fluorescência primária e secundária por incidência de raios-X. (adaptado de [33]) | 25 |
| Figura 15 – Configurações óticas 2D (à esquerda) e 3D (à direita) em espectrómetros EDXRF. (adaptado de [33]) | 26 |
| Figura 16 – Espectros típicos de Intensidade (Contagens por segundo e por canal) em função da Energia (KeV) em amostras de solo com um EDXRF 2D (à esquerda) e com um 3D (à direita). (adaptado de [33]) | 26 |
| Figura 17 – Configuração de um tubo de Raios-X com janela lateral de berílio (adaptado de [33]) | 27 |
| Figura 18 – Espectro contínuo de um tubo de raios-X consoante a voltagem (esquerda), corrente elétrica (no meio) e composição elementar do ânodo.[33] | 27 |
| Figura 19 – Detetor de estado sólido dispersor de energia. (adaptado de [33]) | 28 |
| Figura 20 – Efeito dos filtros de bronze e alumínio no espectro obtido no detector.[33] | 30 |
| Figura 21 – Fotografia ao visor do microondas MLS-1200, e respetivo programa de funcionamento “digestão”, utilizado na preparação de amostras para FAAS. | 34 |
| Figura 22 – Preparação de um copo amostral para o espectrómetro de XRF.(adaptado de [41]) | 36 |
| Figura 23 – Curva de calibração de cálcio para a PM 75 gerada pelo <i>software QStat</i> . Estão representados os valores médios de concentração de cálcio obtidos pelo método alternativo em função dos valores médios de concentração obtidos pelo método de referência, para cada uma das 22 amostras. São visíveis também os limites de confiança de 95% (a vermelho) e a regressão linear dos pontos obtidos (a castanho). | 39 |

| | |
|---|----|
| Figura 24 – Curva de calibração de cálcio para as PMs 76 e 98, gerada pelo <i>software QStat</i> . Estão representados os valores médios de concentração de cálcio obtidos pelo método alternativo em função dos valores médios de concentração obtidos pelo método de referência, para cada uma das 26 amostras. São visíveis também os limites de confiança de 95% (a vermelho) e a regressão linear dos pontos obtidos (a castanho). | 40 |
| Figura 25 – Curva de calibração de ferro para a PM 75 gerada pelo <i>software QStat</i> . Estão representados os valores médios de concentração de ferro obtidos pelo método alternativo em função dos valores médios de concentração obtidos pelo método de referência, para cada uma das 18 amostras. São visíveis também os limites de confiança de 95% (a vermelho) e a regressão linear dos pontos obtidos (a castanho). | 42 |
| Figura 26 – Curva de calibração de ferro para as PMs 76 e 98 gerada pelo <i>software QStat</i> . Estão representados os valores médios de concentração de ferro obtidos pelo método alternativo em função dos valores médios de concentração obtidos pelo método de referência, para cada uma das 25 amostras. São visíveis também os limites de confiança de 95% (a vermelho) e a regressão linear dos pontos obtidos (a castanho). | 43 |
| Figura 27 – Curva de calibração de zinco para a PM 75 gerada pelo <i>software QStat</i> . Estão representados os valores médios de concentração de zinco obtidos pelo método alternativo em função dos valores médios de concentração obtidos pelo método de referência, para cada uma das 17 amostras. São visíveis também os limites de confiança de 95% (a vermelho) e a regressão linear dos pontos obtidos (a castanho). | 45 |
| Figura 28 – Curva de calibração de zinco para a PM 76 gerada pelo <i>software QStat</i> . Estão representados os valores médios de concentração de zinco obtidos pelo método alternativo em função dos valores médios de concentração obtidos pelo método de referência, para cada uma das 15 amostras. São visíveis também os limites de confiança de 95% (a vermelho) e a regressão linear dos pontos obtidos (a castanho). | 46 |
| Figura 29 – Curva de calibração de zinco para a PM 98 gerada pelo <i>software QStat</i> . Estão representados os valores médios de concentração de zinco obtidos pelo método alternativo em função dos valores médios de concentração obtidos pelo método de referência, para cada uma das 18 amostras. São visíveis também os limites de confiança de 95% (a vermelho) e a regressão linear dos pontos obtidos (a castanho). | 46 |
| Figura 30 – Esquema da incidência de fotões raio-X na superfície de contacto entre amostra e milar. ... | 52 |
| Figura 31 – Curva de calibração de cálcio para a PM 75 gerada pelo <i>software QStat</i> . Estão representados os valores de concentração de cálcio obtidos pelo método alternativo em função dos valores de concentração obtidos pelo método de referência, para cada uma das 22 amostras (66 replicados). São visíveis também os limites de confiança de 95% (a vermelho) e a regressão linear dos pontos amostrais obtidos (a castanho). | 61 |
| Figura 32 – Curva de calibração de cálcio para as PMs 76 e 98 gerada pelo <i>software QStat</i> . Estão representados os valores de concentração de cálcio obtidos pelo método alternativo em função dos valores de concentração obtidos pelo método de referência, para cada uma das 26 amostras (78 replicados). São visíveis também os limites de confiança de 95% (a vermelho) e a regressão linear dos pontos amostrais obtidos (a castanho). | 62 |
| Figura 33 – Curva de calibração de ferro para a PM 75 gerada pelo <i>software QStat</i> . Estão representados os valores de concentração de ferro obtidos pelo método alternativo em função dos valores de concentração obtidos pelo método de referência, para cada uma das 18 amostras (54 replicados). São visíveis também os limites de confiança de 95% (a vermelho) e a regressão linear dos pontos amostrais obtidos (a castanho). | 63 |
| Figura 34 – Curva de calibração de ferro para as PMs 76 e 98 gerada pelo <i>software QStat</i> . Estão representados os valores de concentração de ferro obtidos pelo método alternativo em função dos | |

valores de concentração obtidos pelo método de referência, para cada uma das 25 amostras (75 replicados). São visíveis também os limites de confiança de 95% (a vermelho) e a regressão linear dos pontos amostrais obtidos (a castanho)..... 65

Figura 35 – Curva de calibração de zinco para a PM 75 gerada pelo *software QStat*. Estão representados os valores de concentração de zinco obtidos pelo método alternativo em função dos valores de concentração obtidos pelo método de referência, para cada uma das 17 amostras (51 replicados). São visíveis também os limites de confiança de 95% (a vermelho) e a regressão linear dos pontos obtidos (a castanho)..... 66

Figura 36 – Curva de calibração de zinco para a PM 76 gerada pelo *software QStat*. Estão representados os valores de concentração de zinco obtidos pelo método alternativo em função dos valores de concentração obtidos pelo método de referência, para cada uma das 15 amostras (45 replicados). São visíveis também os limites de confiança de 95% (a vermelho) e a regressão linear dos pontos obtidos (a castanho)..... 67

Figura 37 – Curva de calibração de zinco para a PM 98 gerada pelo *software QStat*. Estão representados os valores de concentração de zinco obtidos pelo método alternativo em função dos valores de concentração obtidos pelo método de referência, para cada uma das 18 amostras (54 replicados). São visíveis também os limites de confiança de 95% (a vermelho) e a regressão linear dos pontos obtidos (a castanho)..... 68

Lista de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Tipos de fortificação e suas características.[9] | 5 |
| Tabela 2 – IDR(mg) de ferro para crianças de 1 a 3 anos e de 4 a 6 anos de idade, consoante a biodisponibilidade na sua dieta.[9]..... | 7 |
| Tabela 3 – IDR(mg) de zinco para crianças de 1 a 3 anos e de 4 a 6 anos de idade, consoante a biodisponibilidade na sua dieta. [9]..... | 7 |
| Tabela 4 – Correspondência entre os grupos de produtos com a mesma matriz e respetivas PMs para sua fortificação, usadas na fábrica da Nestlé de Avanca. | 8 |
| Tabela 5 – Gama de temperatura de chama tipicamente alcançada consoante a combinação Combustível-Oxidante utilizada num sistema FAAS.[29]..... | 16 |
| Tabela 6 – Reagentes usados e soluções preparadas para a FAAS. | 33 |
| Tabela 7 – Etapas do programa “digestão” e respetivas características (potência do microondas, temperatura e tempo de duração. | 34 |
| Tabela 8 – Configurações de leitura em FAAS para cálcio, ferro e zinco. | 35 |
| Tabela 9 – Condições de operação do espectrómetro de XRF usadas para a leitura de cálcio, ferro e zinco..... | 37 |
| Tabela 10 – Critérios Nestlé para a aceitação de um modelo de calibração. | 38 |
| Tabela 11 – Concentrações de cálcio típicas especificadas na receita de cada PM. | 39 |
| Tabela 12 – Características dos modelos de calibração de cálcio obtidos e respetivas regressões lineares. | 40 |
| Tabela 13 – Intervalos de confiança à volta do declive e das intersecções dos modelos com o eixo das ordenadas. | 41 |
| Tabela 14 – Concentrações de ferro típicas especificadas na receita de cada PM. | 42 |
| Tabela 15 – Características dos modelos de calibração de ferro obtidos e respetivas regressões lineares. | 43 |
| Tabela 16 – Intervalos de confiança à volta do declive e das intersecções dos modelos com o eixo das ordenadas. | 44 |
| Tabela 17 – Concentrações de zinco típicas especificadas na receita de cada PM..... | 45 |
| Tabela 18 – Características dos modelos de calibração de zinco obtidos e respetivas regressões lineares. | 47 |
| Tabela 19 – Intervalos de confiança à volta do declive e das intersecções dos modelos com o eixo das ordenadas. | 48 |
| Tabela 20 – Concentrações de cálcio, ferro e zinco em amostras de PM75 da linha de produção pelos métodos de referência e alternativo, assim como a respetiva diferença em valor absoluto entre os dois valores obtidos. | 49 |
| Tabela 21 – Concentrações de cálcio, ferro e zinco em amostras de PM76 da linha de produção pelos métodos de referência e alternativo, assim como a respetiva diferença em valor absoluto entre os dois valores obtidos..... | 49 |
| Tabela 22 – Concentrações de cálcio, ferro e zinco em amostras de PM76 da linha de produção pelos métodos de referência e alternativo, assim como a respetiva diferença em valor absoluto entre os dois valores obtidos. | 50 |

| | |
|---|----|
| Tabela 23 – Performance das leituras das amostras de linha de PM 75, 76 e 98. | 50 |
| Tabela 24 – Parâmetros de repetibilidade para o método de espectrometria de XRF (amostras lidas em triplicado para cada modelo de calibração) | 52 |
| Tabela 25 – Pontos utilizados para a construção da curva de calibração Ca75. | 60 |
| Tabela 26 – Pontos utilizados para a construção da curva de calibração Ca7698. | 61 |
| Tabela 27 – Gama de concentrações, regressão linear, número de pontos (n) e coeficiente de determinação (R^2) de cada uma das curvas de calibração de cálcio criadas. | 62 |
| Tabela 28 – Pontos utilizados para a construção da curva de calibração Fe75. | 63 |
| Tabela 29 – Pontos utilizados para a construção da curva de calibração Fe7698. | 64 |
| Tabela 30 – Gama de concentrações, regressão linear, número de pontos (n) e coeficiente de determinação (R^2) de cada uma das curvas de calibração de ferro criadas. | 65 |
| Tabela 31 – Pontos utilizados para a construção da curva de calibração Zn75. | 66 |
| Tabela 32 – Pontos utilizados para a construção da curva de calibração Zn76. | 67 |
| Tabela 33 – Pontos utilizados para a construção da curva de calibração Zn76. | 68 |
| Tabela 34 – Gama de concentrações, regressão linear, número de pontos (n) e coeficiente de determinação (R^2) de cada uma das curvas de calibração de zinco criadas. | 69 |
| Tabela 35 – Análise aos replicados de cada amostra em termos do desvio-padrão das concentrações medidas, para seleção de <i>outliers</i> | 70 |
| Tabela 36 – Resultados para os parâmetros de repetibilidade utilizando uma abordagem de estatística robusta ou clássica. | 71 |

Glossário

Lista de Siglas

| | |
|--------------|--|
| AA | Absorção Atômica |
| APCPC | Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos |
| BPF | Boas Práticas da Fabricação |
| EDXRF | <i>Energy Dispersive XRF</i> – XRF dispersora de energia |
| FAAS | <i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i> – Espectrometria de Absorção Atômica com Chama |
| IDR | Ingestão Diária Recomendada |
| LCO | Lâmpada de Cátodo Ôco |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| ONUAA | Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação |
| PCC | Ponto Crítico de Controlo |
| PM | Pré-Mistura |
| SEC | <i>Standard Error of Calibration</i> – Erro-padrão da Calibração |
| SEP | <i>Standard Error of Prediction</i> – Erro-padrão da Predição |
| SGQ | Sistema de Gestão de Qualidade |
| TF | Tubo Fotomultiplicador |
| UV | Ultra Violeta |
| WDXRF | <i>Wavelength Dispersive XRF</i> – XRF dispersora de comprimentos de onda |
| XRF | <i>X-ray Fluorescence</i> – Fluorescência de Raios-X |

1. Objetivos

Este trabalho teve como objetivos principais a criação, aceitação, verificação e validação de modelos de calibração num método alternativo por espectrometria de XRF (tendo como método de referência a Espectrometria de Absorção Atômica com Chama) para a determinação dos teores de cálcio, ferro e zinco nas pré-misturas 75, 76 e 98, usadas para a fortificação de diversas farinhas infantis na fábrica da Nestlé de Avanca.

2. Introdução

É de grande importância que existam boas práticas na alimentação da população em geral, para que se mantenham bons níveis de saúde pública e todos os benefícios que daí advêm, como uma boa produtividade dos adultos no trabalho e o correto desenvolvimento em crianças, além do aumento dos índices gerais de felicidade.

Apesar de uma boa alimentação ser importante para todos, existem grupos populacionais com uma necessidade acrescida de ingestão de nutrientes pela fase de vida em que se encontram, tais como mulheres grávidas ou lactantes e, sobretudo, as crianças.

2.1 Nutrição infantil

As crianças devem ter acesso a uma alimentação rica em todos os nutrientes necessários ao desenvolvimento corporal, principalmente nos primeiros 2 anos de vida pelo rápido crescimento relativo que se verifica neste período. Com efeito, atingindo 4 a 6 meses de idade, uma criança saudável deverá já ter duplicado o peso com que nasceu. A partir do primeiro ano de idade e até à puberdade, a criança deve ganhar peso a um ritmo estável de aproximadamente 2,5 quilogramas por ano, culminando num novo pico de crescimento e ganho de peso quando atinge a puberdade. As necessidades nutricionais infantis acompanham as mudanças nos ritmos de crescimento: um recém-nascido necessita de mais calorias em relação ao seu tamanho, comparando com uma criança em idade pré-escolar ou escolar. A necessidade de nutrientes volta a crescer quando começa a entrar na puberdade.[1]

O acesso a uma alimentação infantil saudável e completa é geralmente tido como um dado adquirido para a maioria da população em países desenvolvidos. Nos países em desenvolvimento a realidade é bastante diferente. Uma em cinco crianças está desnutrida, sendo a má alimentação associada a metade das mortes infantis a nível global. A desnutrição na infância pode levar a défices cognitivos e físicos, causando efeitos semelhantes em gerações futuras, já que mães desnutridas dão à luz crianças com baixo peso. A nutrição deficiente aumenta também a suscetibilidade e incidência de infeções e está associada a uma resposta diminuída à vacinação.[2,3]

As elevadas necessidades nutricionais no início da vida podem ser satisfeitas caso as crianças tenham acesso a um volume suficiente de leite materno, numa fase inicial, e também a farinhas de cereais enriquecidas em micronutrientes (vitaminas e minerais) após os primeiros

6 meses. A boa nutrição das crianças está intimamente ligada à das mulheres grávidas e latentes, já que só uma mulher saudável e bem nutrida poderá garantir que a sua descendência tem acesso a uma alimentação suficiente.

2.1.1 Importância dos micronutrientes

Os micronutrientes são necessários em pequenas proporções numa dieta para desempenharem papéis-chave no metabolismo, tanto na produção de biomassa como de energia. O ser-humano recebe micronutrientes tanto por ingestão direta, como pela ação dos microrganismos da flora intestinal que metabolizam outros nutrientes que não conseguimos metabolizar naturalmente, dando origem a micronutrientes.[4]

De entre os micronutrientes importantes para o funcionamento do nosso organismo, podemos destacar a vitamina A, vitamina C, vitamina B₁₂, folato, fitoquímicos, cálcio, ferro e zinco. Para haver acesso a estes nutrientes, é necessária uma dieta variada, composta por diversos vegetais e frutos, assim como alimentos de origem animal.[5] A deficiência de ingestão de micronutrientes é um problema global, que pode ter efeitos muito negativos na saúde.

2.1.2 Deficiência em micronutrientes

Estima-se que a deficiência nestes metabolitos, particularmente em vitamina A, iodo, ferro e zinco, afete mais de metade da população mundial, com particular incidência nos países em desenvolvimento onde múltiplas deficiências em micronutrientes coexistem.[6,7,8] Nos países em desenvolvimento a dieta é maioritariamente composta por plantas e cereais, que caracteristicamente têm biodisponibilidade em micronutrientes baixa. Outro factor a ter em conta é a presença de agentes antinutricionais como os fitatos e compostos fenólicos neste tipo de alimentos. O ácido fítico reduz até 15% a biodisponibilidade em micronutrientes numa dieta rica em legumes e cereais, bloqueando a absorção pelo nosso organismo de nutrientes como cálcio, ferro e zinco. Isto acontece pela complexação do ácido fítico a estes compostos, formando um sal insolúvel que têm uma biodisponibilidade em minerais extremamente baixa.[6] Alguns compostos fenólicos têm um efeito parecido ao do ácido fítico no ferro, formando também um complexo e diminuindo a disponibilidade deste micronutriente essencial na dieta.[9] A deficiência em micronutrientes é muitas vezes chamada de “fome oculta”, pois pode ocorrer mesmo quando a dieta tem uma quantidade adequada de energia (calorias).[5]

Os grupos populacionais com maior vulnerabilidade a deficiências em micronutrientes são mulheres grávidas ou lactantes e crianças, pela necessidade acrescida que têm de ingestão destes componentes.[10] Segundo estimativas recentes da Organização Mundial de Saúde

(OMS), globalmente 190 milhões de crianças em idade pré-escolar e 19,1 milhões de mulheres grávidas são deficientes em vitamina A (ou seja, têm uma concentração de retinol no soro inferior a 0,70 $\mu\text{mol/l}$), aproximadamente 100 milhões de mulheres em idade fértil têm deficiência em iodo e uma percentagem estimada de 82% das mulheres grávidas no mundo têm uma ingestão de zinco inadequada para corresponder às necessidades da gravidez.[11] O distúrbio nutricional mais comum no mundo é a deficiência na ingestão de ferro, afetando mais de 1.6 mil milhões de pessoas, quase um quarto da população mundial. A OMS estima que globalmente 42% das mulheres grávidas, 30% das mulheres não-grávidas (entre os 15 e os 50 anos), 47% das crianças em idade pré-escolar (entre os 0 e os 5 anos) e 12,7% dos homens com idade superior a 15 anos sofram de anemia.[10,11,12] Estas deficiências em micronutrientes estão associadas a um aumento da incidência de doenças infecciosas e do potencial para a fatalidade de doenças como a diarreia, sarampo, malária e pneumonia, entre outras.[7] O impacto das deficiências em micronutrientes não se limita à Saúde, expandindo-se também ao panorama económico pela diminuição na produtividade de trabalho causada por incapacidades físicas e mentais colaterais.

2.1.3 A fortificação de alimentos como arma de combate à má nutrição

Diversas estratégias incluindo a educação, modificação da dieta, racionamento de alimentos, suplementação e fortificação, têm sido postas em prática para aumentar a suplementação de micronutrientes a mulheres e crianças.[7,10] Como definido pela OMS e pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (ONUAA), a fortificação refere-se à prática de um aumento deliberado no conteúdo de um micronutriente essencial, ou seja, vitaminas e minerais num alimento, independentemente se os nutrientes já estavam originalmente presentes ou não, com o objetivo de obter benefícios na saúde e comportando riscos mínimos.[13] Esta estratégia de suplementação revelou-se de uma eficácia e segurança muito boas para o combate de deficiências em micronutrientes e já é praticada em países desenvolvidos há um século. No início do século 20, começou a praticar-se a iodação do sal na Suíça; a margarina fortificada em vitamina A foi introduzida na Dinamarca em 1918; e nos anos 30 leite fortificado em vitamina A e farinha fortificada em ferro e complexo B foram introduzidos em bastantes países desenvolvidos. Hoje em dia, estas estratégias de fortificação são quase universais nos países considerados desenvolvidos e têm vindo a ser aplicadas com uma frequência crescente em países de baixo e médio grau de desenvolvimento.[7] A OMS divide a fortificação de alimentos em três categorias: fortificação em massa, fortificação focalizada e fortificação guiada pelo mercado (Tabela 1).[9]

Tabela 1 - Tipos de fortificação e suas características.[9]

| |
|---|
| <p>Fortificação em massa: consiste na adição de um ou mais micronutrientes a alimentos que são comumente consumidos pela população em geral, tais como cereais, condimentos e leite. Usualmente esta prática é instigada, mandatada e regulada pelo governo de cada país.</p> |
| <p>Fortificação focalizada: quando existe fortificação de alimentos que têm como alvo subgrupos específicos da população, ao invés da população como um todo. Exemplos incluem alimentos complementares para crianças, para programas de alimentação escolares, biscoitos para crianças e mulheres grávidas e rações (alimentos compostos de formulação especial) para alimentação de emergência e refugiados.</p> |
| <p>Fortificação guiada pelo mercado: trata-se de uma situação em que um produtor alimentar toma uma opção de negócio em adicionar uma quantidade específica de um ou mais micronutrientes a alimentos processados, dentro dos limites regulatórios estabelecidos pelo governo. Esta prática pode exercer um efeito positivo na saúde pública, contribuindo para o suprimento das necessidades de micronutrientes da população.</p> |

Um caso de grande sucesso desta prática é a fortificação focalizada de farinhas infantis e leite, que tem como objetivo a eliminação de carências de ingestão de micronutrientes na alimentação de crianças. É importantíssimo que as grandes empresas alimentares, em parceria com os governos de diversos países, ponham em prática estratégias de fortificação de alimentos para crianças, de modo a que se possa garantir uma boa nutrição e que a população possa atingir todo o seu potencial. A Nestlé, maior empresa alimentar do mundo, tem-se assumido como exemplo nesta prática.

2.2 Nestlé: estratégia global e nacional

A Nestlé está empenhada em ajudar na redução de deficiências em micronutrientes a uma escala global. A estratégia desta empresa passa por trabalhar com os governos locais e autoridades de saúde para identificar lacunas nutricionais nas dietas e supri-las, fortificando produtos alimentares populares. Em 2014, a Nestlé forneceu mais de 183 mil milhões de porções de alimentos fortificados. O objetivo desta empresa é, neste ano, atingir os 200 mil milhões.[14]

Em Portugal, a maior unidade fabril da Nestlé encontra-se em Avanca, freguesia pertencente ao distrito de Aveiro. Nesta fábrica, produzem-se Leite em Pó, Farinhas Infantis, Cereais de Pequeno-Almoço, Bebidas de Cereais, Produtos direcionados à restauração e Natas Refrigeradas. A estratégia nacional está em linha com a global da Nestlé, sendo de prática contínua a fortificação de alimentos em micronutrientes essenciais. Um exemplo importante é

a fortificação de farinhas infantis em cálcio, ferro e zinco.

2.2.1 Fortificação de farinhas infantis na fábrica da Nestlé de Avanca

Em crianças recém-nascidas, assegurar uma dieta de leite materno é uma maneira eficaz de evitar deficiências em micronutrientes, sendo em muitos dos países em desenvolvimento a maior fonte de micronutrientes durante o primeiro ano de vida. A OMS recomenda que a dieta de crianças até aos 6 meses seja exclusivamente composta por leite materno e que este alimento continue a fazer parte da dieta até ao final do segundo ano de idade. Após os 6 meses, é importante que os alimentos infantis complementares sejam diversos e o mais ricos possível em micronutrientes, para preencher eventuais lacunas nutricionais.[9,15] Uma excelente resposta dada pela Nestlé a esta necessidade e um caso de sucesso de fortificação focalizada foi a criação de farinhas infantis fortificadas. A fortificação das farinhas infantis na fábrica da Nestlé de Avanca faz-se pela adição a seco de pré-mistura (PM) de vitaminas e minerais às bases de produto. Esta prática permite um aumento abrupto na riqueza nutricional das farinhas infantis em micronutrientes como cálcio, ferro, zinco e vitaminas, que são essenciais para a saúde infantil.

O cálcio é o mineral mais abundante no corpo humano. É o principal componente dos ossos e dentes, tendo também uma importância grande em muitas das funções vitais do nosso organismo, como a contração muscular, transmissão de impulsos nervosos, produção hormonal e contração e expansão dos vasos sanguíneos. As crianças têm uma necessidade especial de cálcio, por estarem numa fase de pleno crescimento e desenvolvimento ósseo. Uma baixa ingestão de cálcio durante a infância pode diminuir a densidade óssea, resultando num risco de osteoporose acrescido durante a idade adulta. Num estudo em Hong Kong, crianças com 5 anos com uma ingestão inferior a 250 mg de cálcio por dia mostraram ter uma composição mineral óssea 14% inferior e uma estatura 4 % reduzida, comparando com crianças que consumiram o dobro do cálcio. A necessidade de ingestão diária recomendada (IDR) de cálcio pela OMS e ONUAA é de 417 mg para crianças até aos 3 anos de idade e 500mg para crianças entre os 4 e os 6 anos de idade.[9,16]

A maioria do ferro no corpo humano está presente nos eritrócitos sob a forma de hemoglobina, onde a sua principal função é transportar oxigénio dos pulmões para os tecidos. O ferro é também um componente importante de variados sistemas enzimáticos, como os citocromos, que estão envolvidos no metabolismo oxidativo. É armazenado no fígado sob a forma de ferritina e hemossiderina. A deficiência em ferro é o distúrbio alimentar mais comum no mundo e pode causar anemia, que se define como a existência de uma baixa concentração

de hemoglobina no sangue. A anemia afeta a performance física e cognitiva, aumentando a mortalidade maternal e infantil. A IDR de ferro foi estimada pela OMS e ONUAA, consoante a sua biodisponibilidade (Tabela 2). A biodisponibilidade do ferro é de 15% quando a dieta é rica em vitamina C e proteína animal, de 10% quando a dieta é rica em cereais mas inclui fontes de vitamina C e de 5% quando a dieta é fraca em vitamina C e proteína animal.[9,17]

Tabela 2 - IDR(mg) de ferro para crianças de 1 a 3 anos e de 4 a 6 anos de idade, consoante a biodisponibilidade na sua dieta.[9]

| Biodisponibilidade de ferro na dieta | IDR(mg) em crianças de 1 a 3 anos de idade | IDR(mg) em crianças de 4 a 6 anos de idade |
|---|---|---|
| 15% | 3,9 | 4,2 |
| 10% | 5,8 | 6,3 |
| 5% | 11,6 | 12,6 |

O zinco não é armazenado no nosso organismo, sendo por isso precisa uma ingestão diária deste mineral que é essencial para a manutenção do sistema imunitário e para o crescimento e desenvolvimento do corpo humano. A deficiência em zinco afeta cerca de um terço da população mundial, estimando-se que seja responsável por 16% das infeções do trato respiratório inferior e por 10% dos casos de diarreia. É atribuída relação entre a deficiência em zinco e cerca de 800 mil das mortes anuais. Outros efeitos desta deficiência nutricional são o crescimento reduzido na infância, doenças de pele, reduzida capacidade de cicatrização e perda de cabelo.[18] A IDR de zinco foi estimada pela OMS e ONUAA, consoante a sua biodisponibilidade (Tabela 3). À semelhança do que acontece com o ferro, a biodisponibilidade do zinco na dieta infantil depende da sua riqueza. Para dietas ricas em proteína animal é alta, moderada para dietas ricas em legumes e sementes ou dietas que incluam cereais fermentados, e baixa em dietas pobres em proteína animal ou vegetais ricos em zinco.[9]

Tabela 3 - IDR(mg) de zinco para crianças de 1 a 3 anos e de 4 a 6 anos de idade, consoante a biodisponibilidade na sua dieta. [9]

| Biodisponibilidade de zinco na dieta | IDR(mg) em crianças de 1 a 3 anos de idade | IDR(mg) em crianças de 4 a 6 anos de idade |
|---|---|---|
| Alta | 2,0 | 2,4 |
| Moderada | 3,4 | 4,0 |
| Baixa | 6,9 | 8,0 |

As farinhas infantis produzidas na fábrica da Nestlé de Avanca têm sempre três componentes base: base de produto, pré-mistura (PM) e probióticos. As bases de produto são a base das fórmulas infantis contendo farinhas de cereais, água, óleos, por vezes uma percentagem de leite, que formam uma sopa líquida à qual, depois do processamento térmico, se adiciona a pré-mistura de vitaminas. As farinhas são hidrolisadas enzimaticamente por α e β -amilases. Os probióticos são misturas de microrganismos sob a forma de pó que conferem efeitos fisiológicos favoráveis aos consumidores de farinhas infantis. As PMs são misturas que podem conter carbonato de cálcio, fumarato de ferro, aroma de vanilina e um bloco vitamínico que é a fonte de diversas vitaminas (incluindo vitamina C) e zinco, podendo também ser a fonte de ferro em detrimento do fumarato de ferro. Antigamente, para cada farinha infantil produzida existia uma respetiva PM para a sua fortificação em micronutrientes. Atualmente, as PMs foram agrupadas em apenas 3 receitas diferentes para uso em farinhas infantis: a 75, 76 e 98. A existência de PMs com diferente receita explica-se pelo agrupamento de produtos consoante as semelhanças de matriz (Tabela 4).

Tabela 4 - Correspondência entre os grupos de produtos com a mesma matriz e respetivas PMs para sua fortificação.

| PM | Grupo |
|----|-----------------------------|
| 75 | Farinhas lácteas com banana |
| 76 | Farinhas não lácteas |
| 98 | Farinhas lácteas sem banana |

Na preparação destas pré-misturas, cada ingrediente da receita é pesado pelo operador da linha de produção, colocado num recipiente específico (tote) e misturado em condições operacionais específicas. Além dos componentes base, também podem ser adicionadas frutas, maltodextrina e leite em pó MSK, entre outros. Todos os componentes são adicionados e misturados a seco na linha *Dry-Mix*, dando origem ao produto final que posteriormente segue para a linha de enchimento. Caso a sua conformidade com os limites nutricionais pré-definidos se verifique, o produto é liberado, sendo dado como apto para encaminhamento para o Centro de Distribuição da Nestlé em Avanca.

2.2.2 Política da Qualidade na Nestlé

Em qualquer lado no mundo, o nome Nestlé representa uma promessa ao Consumidor da segurança e elevada qualidade dos seus produtos. Isto apenas foi possível pelo estabelecimento da Qualidade como uma base operacional da empresa, estando este princípio

incluído na sua premissa de Nutrição, Saúde e Bem-Estar.[14,19] Para criar valor de forma sustentada e para efetivamente e eficientemente construir a confiança dos clientes e consumidores, a Qualidade para a Nestlé é:

- Garantir a **segurança do alimento e conformidade total** respeitando as políticas, princípios e padrões da empresa com transparência total;
- Assegurar a **preferência e consistência** para agradar aos consumidores e clientes valorizando o que eles valorizam e oferecendo produtos, sistemas e serviços que sempre alcancem ou excedam as expectativas;
- Apontar as expectativas para **zero defeitos e zero desperdícios** procurando continuamente por oportunidades para aplicar melhoria contínua de modo a desenvolver vantagem competitiva;
- Garantir o **comprometimento de todos** ao longo da cadeia de valor e a todos os níveis da organização para construir a Cultura de Qualidade da Nestlé.[19]



Figura 1 - Diagrama dos princípios de Qualidade na Nestlé, tendo como objetivo central a confiança dos consumidores e clientes (adaptado de [19]).

2.2.3 Sistema de Gestão de Qualidade da Nestlé

Como em qualquer empresa, manter um nível elevado de Qualidade só é possível com a implementação de um sistema eficaz para este efeito, o Sistema de Gestão da Qualidade (SGQ) da Nestlé. Este é composto por 3 elementos principais: os Padrões de Qualidade, um Ciclo de Gestão para a Melhoria Contínua e um Sistema de Gestão Baseado em Processos.[19] O SGQ da Nestlé é uma plataforma global, transversal a qualquer instalação da empresa, para a garantia da segurança alimentar, cumprimento dos padrões de qualidade e criação de valor junto dos consumidores. Existem audições e verificações frequentes por parte de agências independentes e certificadas para que haja uma prova de conformidade com as requisições internas e as normas ISO, assim como respetiva legislação.



Figura 2 - Esquema dos 5 elementos que compõem o SGQ da Nestlé.[20]

O SGQ (Figura 2) começa nas explorações agrícolas, existindo parcerias com os diversos fornecedores de modo a que também estes melhorem a sua qualidade e adotem práticas amigas do ambiente. Isto permite que as matérias-primas utilizadas por cada instalação industrial sejam sempre de elevada qualidade. A qualidade dos produtos constrói-se desde o processo de desenvolvimento dos mesmos, havendo desde o início a preocupação para a criação de um *design* que cumpra todas as exigências dos consumidores e regulamentações. Na Nestlé são aplicadas internacionalmente as reconhecidas Boas Práticas de Fabricação (BPF), que cobrem todos os aspetos da fabricação, incluindo procedimentos operacionais, formação dos Colaboradores, manutenção de equipamentos e manuseamento dos materiais. Para garantir a segurança alimentar, está implementado o sistema de Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos (APCPC). Este sistema preventivo, também internacionalmente reconhecido, avalia com base científica os processos, identificando e controlando os perigos que são significativos para a segurança alimentar, definindo Pontos Críticos de Controlo (PCC). O APCPC cobre todo o processo de produção, desde as matérias-primas, passando pela distribuição até ao consumo. Os planos APCPC das unidades fabris da Nestlé são verificados por entidades externas certificadas com as normas ISO 22000:2005/ISO 2202-1. Finalmente, é garantido que os produtos são usados da melhor maneira pelo consumidor, integrando nos mesmos informação para esse efeito.[19,20,21]

2.2.4 Garantia de Qualidade na fábrica da Nestlé de Avanca

Todos os departamentos da fábrica da Nestlé de Avanca (Produção, Garantia de Qualidade, Serviços Técnicos, Logística, Serviços Administrativos) estão comprometidos com o cumprimento do plano definido para a execução do SGQ. O Departamento de Garantia da

Qualidade dá apoio a toda a fábrica para este efeito. Neste departamento, além do apoio logístico dado aos restantes departamentos, é feito o Controlo de Qualidade por via de análises físico-químicas, microbiológicas e sensoriais aos produtos em diferentes fases de produção, assim como às matérias-primas. São feitas também análises e testes a material de embalagem. Cabe ao Departamento de Garantia de Qualidade, após análises, a responsabilidade de dar ordem da liberação ou rejeição de cada produto consoante a conformidade ou não do mesmo com os seus parâmetros de Qualidade específicos.

Controlo de Qualidade na linha de produção

A implementação na linha de produção de metodologias analíticas alternativas capazes de reproduzir fielmente os resultados obtidos por metodologias analíticas de referência pode trazer diversas vantagens como a poupança de tempo e recursos. Um dos casos mais importantes na fábrica de Avanca é a quantificação de minerais (cálcio, ferro e zinco) das PMs utilizadas para a fortificação de farinhas infantis. O método analítico de referência é a Espectroscopia de Absorção Atómica com Chama (FAAS – *Flame Atomic Absorption Spectrometry*), que é efetuado no laboratório Físico-Químico do Departamento de Garantia de Qualidade. Apesar de muito preciso, este método é extremamente demorado (cerca de 5h). Um método analítico alternativo, a Espectrometria por Fluorescência de Raios-X (XRF- *X-Ray Fluorescence*) foi implementado no *Dry-Mix*, possibilitando uma análise quase imediata ao conteúdo em cálcio, ferro e zinco das PMs recém-criadas pelo operador de linha. Caso se verifique que a quantidade relativa destes minerais está fora dos limites especificados na respetiva receita da PM, a mistura tem que ser repetida e em último caso deve ser executada nova dosagem e mistura. Este é considerado um PCC da linha de produção de farinhas infantis já que, caso haja a produção de uma PM com teores em micronutrientes fora do especificado e utilização da mesma, isto vai traduzir-se numa fortificação insuficiente ou em excesso do produto final, originando produtos com valores nutricionais fora de normas e que por isso são encaminhados para eliminação. Um turno de produção inteiro de uma determinada farinha infantil na fábrica da Nestlé de Avanca pode ascender a várias dezenas de toneladas de produto, originando perdas financeiras importantes caso haja rejeição após a produção estar completa.

3. Determinação de cálcio, ferro e zinco em PM

3.1 Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (FAAS)

A Absorção Atômica (AA) ocorre quando radiação com um comprimento de onda adequado incide num grupo de átomos livres no estado fundamental, causando a absorção de radiação por parte dos elétrons que transitam para o estado excitado. Quando um elétron excitado volta à camada orbital de origem, emite um fóton com energia que é específica de cada elemento. A técnica FAAS utiliza este princípio para medir a concentração de determinados analitos numa amostra.[22] De uma maneira geral, os sistemas de FAAS são compostos por fontes de radiação ótica, espelhos, modulador, atomizador, fendas, monocromador, detetor, amplificador e processador de sinal.

3.1.1 Fontes de radiação ótica

Na FAAS, os comprimentos de onda de interesse estão nas gamas ultravioleta (UV) e visível. Existem dois tipos básicos de fontes de radiação que são usados de maneira comum em instrumentos de absorção atômica: fonte contínua e fonte de linhas. Uma fonte contínua, também conhecida como fonte de banda larga, emite radiação que contém uma ampla gama de comprimentos de onda. O traçado da intensidade no eixo das ordenadas e do comprimento de onda no eixo das abcissas tem a forma de uma distribuição Gaussiana ampla, com alguns picos pequenos e depressões rasas. Os comprimentos de onda de emissão de uma fonte contínua podem ter uma gama de centenas de nanómetros. Exemplos de lâmpadas consideradas fontes contínuas de radiação são as de deutério, mercúrio, xénon, e tungsténio. Estas lâmpadas são usadas como corretoras de background (dispositivos de correção de ruído) em instrumentos de FAAS e não para a deteção de analito.[23,24]

Fontes de linhas são lâmpadas que emitem gamas de radiação extremamente curtas. As mais comuns são as lâmpadas de cátodo ôco (LCO) que conseguem isolar linhas mais estreitas que 10^{-3} e 10^{-2} nm. Assim, este tipo de lâmpada, graças à sua estabilidade, é uma excelente fonte de linhas para a grande maioria dos elementos.[25]

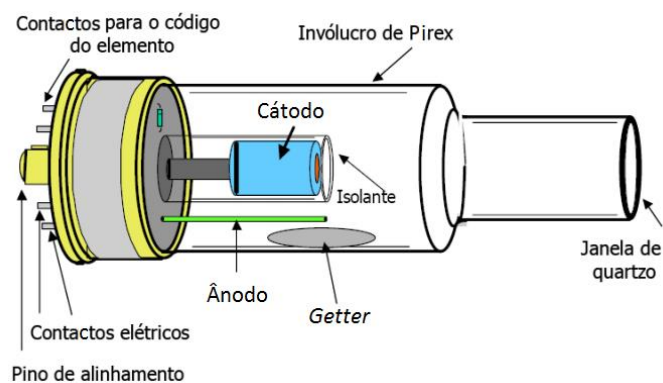


Figura 3 – Ilustração de uma LCO (adaptado de [25]). O *Getter* é um substrato presente em alguns modelos de LCO para absorver gases residuais contaminantes.[26]

As lâmpadas de cátodo ôco (Figura 3) são enchidas com um gás nobre (Ne ou Ar) a uma pressão entre os 130 e os 700 Pa. O ânodo, um fio de tungstênio, e o cátodo, contruído exclusivamente ou em parte pelo metal a ser analisado, estão selados no invólucro de pirex. A janela por onde passa a radiação normalmente é de quartzo, porque o vidro absorve radiações UV.[25]

Quando aplicado um potencial de 300 V através dos eléctrodos, produz-se uma corrente de 5 a 15 miliamperes (mA). À medida que os electrões migram para o cátodo, colidem com os átomos do gás nobre e ionizam-nos. Estes átomos de gás nobre carregados colidem contra o cátodo. Se a energia dos catiões de gás nobre for suficiente, alguns dos átomos metálicos do cátodo vão transitar para a fase gasosa, num processo chamado de pulverização catódica ou “*Sputtering*”, e são posteriormente excitados por colisão com electrões de alta energia. Quando voltam ao estado fundamental, os átomos emitem fotões de radiação UV ou visível de comprimento de onda específico. Esta emissão normalmente corresponde a apenas um ou poucos saltos energéticos diferentes, resultando isto na formação de uma fonte de luz relativamente pura. As lâmpadas de LCO têm um tempo de vida limitado pela velocidade a que se dá o processo de “*Sputtering*”. Os átomos do cátodo vão sendo removidos e depositados no invólucro da lâmpada sendo isto a causa do seu escurecimento, que resulta num decréscimo progressivo na intensidade da lâmpada até que esta deixa de ser funcional.[23,25]

3.1.2 Espelhos

Os espelhos são uma constante em todos os espectrómetros e têm a função de redirecionar a radiação, refletindo-a numa direção específica. A maioria das unidades de FAAS usa espelhos que apenas refletem radiação com comprimento de onda dentro da gama UV ou Visível. São feitos de vidro liso ou côncavo revestido com uma superfície metálica refletiva,

normalmente de alumínio. Em alguns casos, um suporte plástico pode ser usado como substrato de revestimento. Os metais são banhados na superfície do espelho por um processo conhecido por revestimento de camada fina a vácuo.[23]

3.1.3 Modulador

Um modulador é um dispositivo que divide um raio de luz radiante em duas direções. Tem uma forma circular, dividida em quartos de círculo. Dois dos quartos do círculo estão abertos enquanto os outros têm uma superfície espelhada. O modulador gira rapidamente, alternando entre o modo refletivo, em que reflete a luz para a célula que contém a amostra, e o modo de transmissão, em que deixa a radiação passar (Figura 4). Se o modulador girar mais rápido do que a flutuação de ruído no sinal de origem, uma medição precisa do ruído de fundo pode ser obtida e corrigida nas medições em FAAS.[23]

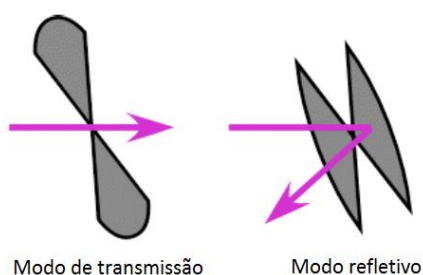


Figura 4 – Modos de transmissão e refletivo do modulador em sistemas de FAAS.(adaptado de [23])

3.1.4 Atomizador

O atomizador (Figura 5) em sistemas FAAS é onde se dão todas as reações químicas. De um modo simplificado, consiste num tubo de entrada, entradas de combustível e ar, um nebulizador, a câmara de nebulização e o queimador.

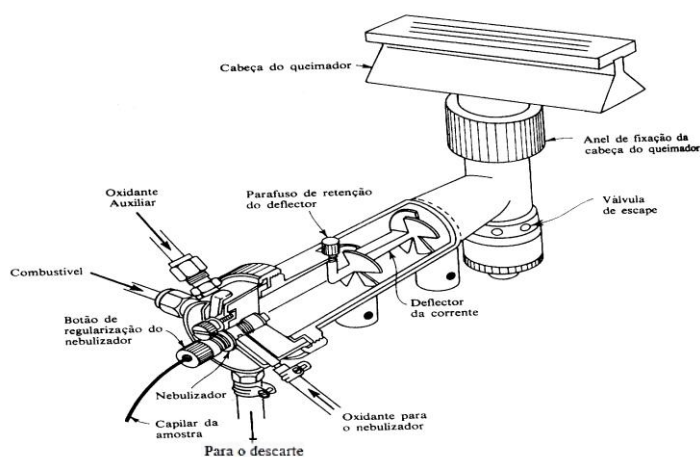


Figura 5 – Esquema de um atomizador. (adaptado de [27])

Amostras aquosas movimentam-se através do capilar para o nebulizador que atomiza o líquido em pequenas gotículas. A mistura das gotículas de amostra com o oxidante e o combustível é homogeneizada pelos defletores da corrente dentro da câmara de nebulização, antes de esta mistura ser atomizada na chama. O líquido da amostra é puxado para dentro do nebulizador por um fenómeno conhecido como efeito de Bernoulli, onde um fluido compressível (os gases oxidante e combustível) é conduzido por uma constrição num tubo.[23] O princípio de Bernoulli é o diferencial de pressão criado quando gases fluem através de uma constrição. Este princípio traduz-se na equação de Bernoulli:

$$\text{Energia Total} = \frac{v^2}{2} + gh + \left(\frac{\gamma}{\gamma-1} \right) \frac{p}{\rho} \quad (1.1)$$

em que γ é a razão dos calores específicos do fluido, p é a pressão num ponto, ρ é a densidade nesse ponto, v é a velocidade do fluido no ponto, g é aceleração devida à gravidade, e h é a altura do ponto acima de um plano de referência. Como a energia total do sistema é conservada é igual a uma constante para esse mesmo sistema.[23]

Tomando o exemplo do tubo de Venturi (Figura 6), considere-se uma molécula gasosa a mover-se do ponto 1 para o ponto 2. Embora todas as variáveis da equação da energia total mudem, considere-se apenas a pressão e a velocidade por serem os contribuidores dominantes para a energia total. Quando a molécula se move do ponto 1 para o ponto 2, ela vai encontrar uma pressão menor, tornando-se o h também mais pequeno. Para que a energia total se mantenha, a velocidade do fluido terá de ser maior. Assim, como resultado da equação de Bernoulli, a maior velocidade ocorre à menor pressão e vice-versa.

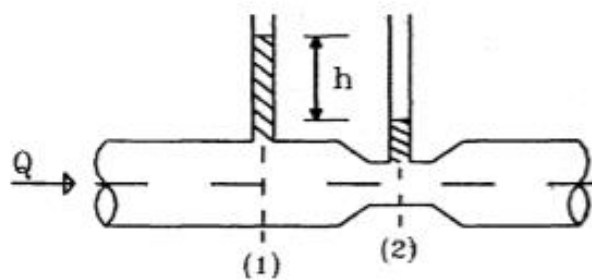


Figura 6 – Tubo de Venturi.[28]

A discussão de Bernoulli é apenas ilustrativa do conceito geral dos balanços de pressão e fluxo. O desenho da câmara de admissão em unidades de FAAS é bastante diferente do tubo de Venturi, mas os princípios da equação de Bernoulli causam a entrada da amostra na câmara de nebulização. Se um reservatório de fluido (o capilar por onde se dá a entrada da amostra

aquosa) está ligado à região de baixa pressão em que há a constrição de entrada dos gases combustível e oxidante, a menor pressão presente na constrição vai sugar fluido para o interior do sistema (câmara de nebulização). O botão de regularização do nebulizador, no capilar de entrada, é usado para regular o fluxo. O efeito de Bernoulli causa um movimento livre do líquido da amostra para o FAAS sem ser necessária uma bomba.[23]

De seguida a amostra entra no nebulizador, onde é passada à forma de mistura aerossol. O tamanho de partícula deste aerossol é importante pois vai definir a quantidade de analito que de facto alcança a chama. Partículas com diâmetro maior que 20 µm ficam presas na câmara de nebulização por aderirem às superfícies e fluem para o contentor de descarte. Apenas 10% da amostra que entra no nebulizador chega à chama. O tamanho das partículas está ligado aos caudais do gás e da amostra que entram na câmara, relação esta que é de uma maneira relativamente fiel descrita pela equação

$$\bar{d} = \frac{585}{v} \sqrt{\frac{\gamma}{\rho}} + 597 \left[\frac{\eta}{\sqrt{\gamma\rho}} \right]^{0.45} 1000 \left(\frac{Q_{\text{liquido}}}{Q_{\text{gás}}} \right)^{1.5} \quad (2.2)$$

Em que \bar{d} é o diâmetro médio de partícula, que é função da viscosidade (η), densidade (ρ) e tensão superficial (γ) da solução da amostra, dos caudais do gás de nebulização ($Q_{\text{gás}}$) e da solução aspirada (Q_{liquido}), e da velocidade do gás de nebulização (v).

Depois de a amostra ser sugada para o nebulizador e transformada numa mistura aerossol, é misturada com o combustível e oxidante pelas duas barbatanas do defletor de corrente. Os combustíveis normalmente usados em sistemas de FAAS são o acetileno (para chamas mais quentes) e o hidrogénio (para chamas mais frias). O oxigénio da corrente de ar ou do óxido nitroso é usado como oxidante para regular a temperatura da chama. Diferentes combinações combustível-oxidante originam temperaturas diferentes (Tabela 5).[23,29]

Tabela 5 – Gama de temperatura de chama tipicamente alcançada consoante a combinação Combustível-Oxidante utilizada num sistema FAAS.[29]

| Combustível-Oxidante | Gama de Temperatura Alcançada |
|-------------------------|-------------------------------|
| Hidrogénio-Ar | 2000-2100 °C |
| Acetileno-Ar | 2100-2400 °C |
| Acetileno-Óxido Nitroso | 2600-2800 °C |

Misturas ricas em combustível originam chamas mais frias e misturas ricas em oxidante chamas mais quentes. A análise de um analito em particular tem uma temperatura ótima e assim, os caudais de combustível e oxidante podem ser regulados para se atingir a temperatura

adequada à leitura da concentração desse analito. Depois da combinação de combustível e oxidante ser misturada com a amostra, atravessa a cabeça do queimador e passa para dentro da chama.

Diversos processos e reações ocorrem rapidamente assim que as moléculas de amostra entram na chama. Primeiro, a água na solução evapora e é removida do complexo de metais. De seguida, o calor da chama degrada complexos orgânicos e inorgânicos desidratados a estados atômicos gasosos que são excitados pela energia térmica da chama. Na porção inferior da chama, ocorre absorção de fótons pelos átomos em estado fundamental. À medida que o analito sobe até às regiões mais frias da chama, os átomos excitados relaxam e emitem fótons (que serão direcionados para o monocromador). Fumos e metais provenientes da chama são continuamente removidos do laboratório por um sistema de exaustão.[23]

3.1.5 Monocromador e Fendas

Os monocromadores têm a função de separar comprimentos de onda de um feixe, através do fenómeno da dispersão luminosa. São usados para selecionar as linhas emitidas pela LCO e rejeitar ao máximo as emissões provenientes da chama. O tipo mais usual de monocromadores são os sistemas de gradeamento ou *grating systems* (Figura 7). Grades de difração são materiais com um elevado número de fendas e cumes paralelos e pouco espaçados. A difração causa interferência construtiva em pontos únicos para cada comprimento de onda. As fendas são componentes essenciais de um monocromador, sendo ajustáveis e permitindo a entrada de apenas um feixe fino de luz no monocromador e a seleção de apenas uma pequena banda de comprimentos de onda à saída que alcançará o detetor.[23,30]

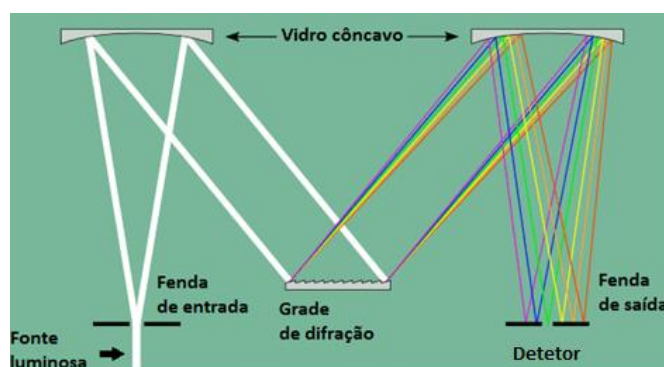


Figura 7 – Sistema de gradeamento num Monocromador de Czerny-Turner. (adaptado de [23])

3.1.6 Detetor e Amplificador

Os aparelhos de FAAS requerem que a energia contida em fótons seja convertida em sinal elétrico mensurável, seguido de amplificação. Um dos tipos de detetor mais utilizado é o tubo fotomultiplicador (TF). É uma extensão do fototubo (Figura 8) em que numerosos dínodos (pares de elétrodos) estão alinhados de maneira linear ou circular.[23]

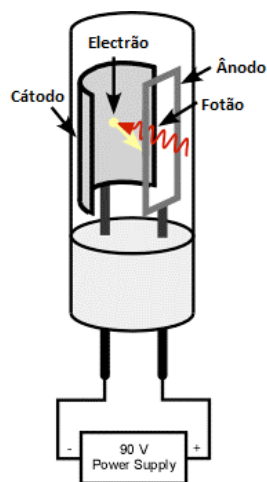


Figura 8 – Ilustração de um Fototubo. (adaptado de [23])

A maioria dos elétrodos num TF funcionam tanto como ânodo, como cátodo com cada dínodo, tendo uma diferença de potencial de +90 V. Então, o potencial aumenta 90 V sempre que um elétron vai de um elétrodo para o próximo. Quando nove dínodos são usados (o que é frequente em TFs) o resultado líquido será uma quantidade de 10^6 a 10^7 elétrões por cada fóton que entra no detetor. Isto gera uma amplificação considerável de sinal, mesmo que este seja fraco. É por esta razão que os TFs são excelentes detectores e amplificadores para medidas em FAAS, pela pequena intensidade de radiação neste sistema. O sinal eletrónico é posteriormente conduzido ao processador de sinal que o converte num formato que o operador possa utilizar para saber o resultado da medição.[23,31]

Todos os sistemas modernos e mesmo alguns mais antigos de AA usam tecnologia de duplo feixe (Figura 9), em que o instrumento divide o feixe da lâmpada em duas trajetórias diferentes, dependendo do tempo. Um dos feixes não atravessa a amostra e é usado para medir a intensidade da radiação e flutuações na lâmpada, enquanto o outro é usado para medir a radiação que interage com o analito.[23]

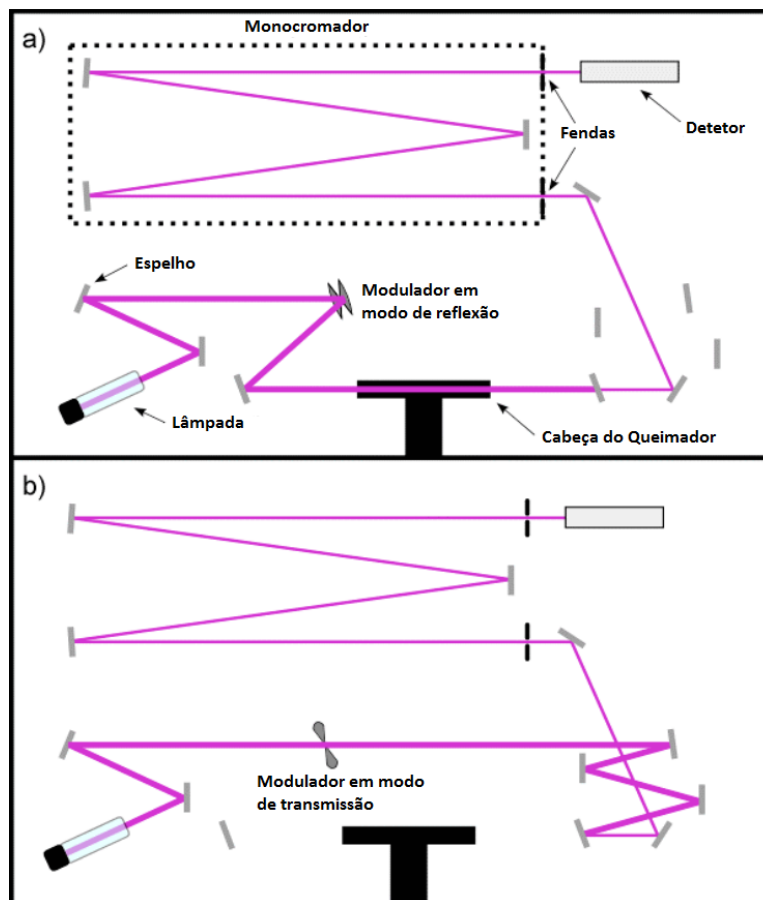


Figura 9 – Funcionamento de um sistema de feixe duplo em FAAS. a) quando o modulador está em modo de reflexão, direciona o feixe luminoso para a amostra; b) quando o modulador está em modo de transmissão não interage com o feixe e este vai para o monocromador sem interagir com a amostra. (adaptado de [23])

A divisão do feixe de origem é feita com o modulador, que metade do tempo está em modo de transmissão (deixa o feixe luminoso passar, não atravessando a chama que contém os analitos metálicos em forma de gás atomizado) e na outra metade do tempo está em modo de reflexão (reflete o feixe por um sistema de espelhos, causando a sua passagem através da amostra). Uma porção dos átomos metálicos absorve um comprimento de onda específico que corresponde ao emitido pela lâmpada, resultando isto numa redução quantitativa na radiação após atravessar a amostra. Após interação com a amostra ou, no caso do feixe de referência, evitar a amostra na cabeça do queimador, os feixes são refletidos por um sistema de espelhos até alcançarem o monocromador e depois o detetor.[23]

3.1.7 Interferências em FAAS

Nenhum sistema em FAAS está livre de interferências, embora seja reconhecidamente uma técnica bastante precisa. Uma interferência é qualquer ocorrência que modifica o sinal, por exemplo, entre duas leituras com a mesma concentração de analito numa amostra. Existem dois tipos de interferências, as espectrais e as não espectrais.[25]

Interferência espectral

Acontece quando existe sobreposição do sinal do analito de interesse com sinais devidos a outros elementos ou moléculas presentes na amostra, ou provenientes da chama, a radiação de fundo. A sobreposição do sinal do analito de interesse com o de outros elementos na amostra é eliminada de uma maneira eficaz pela escolha de um comprimento de onda de funcionamento adequado e com a ação dos monocromadores em sistemas de FAAS de alta resolução.[25]

A interferência da radiação de fundo (*background*) é uma atenuação adicional do feixe de absorção específico ao nível da nuvem atômica, devido a uma absorção molecular e a uma dispersão da radiação. É minimizada pela já referida ação do modulador situado à saída do feixe de luz da LCO. Adicionalmente, foi criada a correção de *background* pela ação de lâmpadas de deutério (Figura 10).[23,25]

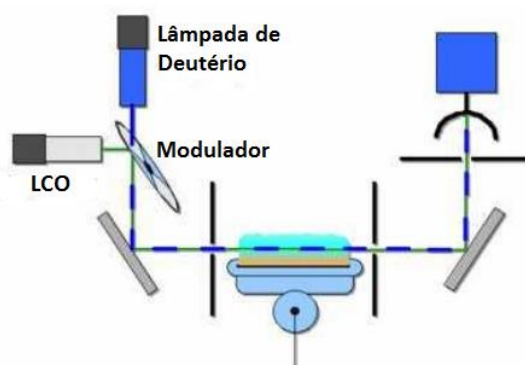


Figura 10 – Esquema de funcionamento da correção de “background” por lâmpada de deutério. (adaptado de [32])

O funcionamento deste sistema é relativamente simples. Quando o modulador dá passagem à radiação proveniente da lâmpada de deutério, o sinal medido no detetor é o do “background”. Já quando o modulador dá passagem à radiação da LCO, é medida a atenuação total do feixe por passagem no queimador (absorção atômica mais ruído de *background*). Subtraindo ambos os sinais medidos, vamos obter apenas o sinal da absorção atômica.[32]

É de ter em conta também o ruído ambiental. Este tem a ver com as condições no laboratório, exteriores ao equipamento de FAAS. É de enorme importância que o equipamento esteja afastado de zonas com alta vibração, ou com grandes alterações de temperatura.[23] A chama tende a aquecer consideravelmente o interior do aparelho, sendo por isso fulcral que exista um sistema de exaustão bem centrado na zona da chama. Um aquecimento excessivo vai causar alterações em componentes essenciais como as fendas do monocromador, levando a desvios no sinal medido.

Interferência não espectral

Afeta a atomização do analito e pode ser causada pelo efeito matriz, interferências químicas ou interferências de ionização.

O efeito matriz acontece quando a eficiência de nebulização é diferente entre amostras e padrões, ou seja, se a amostra é mais viscosa e/ou a sua tensão superficial difere da dos padrões. Para contrariar este efeito, deve-se ajustar ao máximo a matriz dos padrões à matriz das amostras. Ou seja, ácido ou outro reagente adicionado às amostras durante a preparação deve ser adicionado tanto aos padrões como ao branco nas mesmas concentrações. [23,25]

Existem interferências químicas quando existe a formação de compostos termicamente mais estáveis com o analito, causando uma decomposição incompleta pela chama. Para solucionar este problema pode-se adicionar por exemplo óxido de lantânio, que forma preferencialmente um composto termicamente estável com o interferente, e/ou aumentar a energia da chama, alterando a combinação ou proporção de oxidante/combustível. [23,25]

As interferências de ionização são causadas pela perda de eletrões provenientes dos átomos excitados e acontecem normalmente em chamas de elevada temperatura. Uma maneira de minimizar este acontecimento é adicionar um elemento facilmente ionizável à amostra. A presença de um excesso de eletrões livres diminui a ionização da amostra, sendo assim aumentada a sensibilidade ao elemento de interesse. [23,25]

3.2 Espectrometria por Fluorescência de Raios-X

Na espectrometria por XRF irradia-se a amostra com raios-X produzidos numa fonte, que na maioria dos casos é um tubo de raios-X, podendo alternativamente ser também um sícrotron (acelerador de partículas cíclico) ou um material radioativo. Os elementos presentes na amostra emitem radiação de raios-X fluorescente com energias discretas, que são características. Medindo as energias da radiação emitidas pela amostra é possível determinar que elementos estão presentes, sendo este chamado de Passo Qualitativo. Medindo as intensidades das energias emitidas, é possível determinar qual a quantidade de cada elemento presente na amostra, sendo este chamado de Passo Quantitativo.[33]

Os espectrómetros de XRF podem ser divididos em dois tipos de sistema principais: os espectrómetros de XRF dispersores de energia (EDXRF – *Energy Dispersive XRF*) e os espectrómetros de XRF dispersores de comprimento de onda (WDXRF – *Wavelength Dispersive XRF*).[34] A diferença entre os dois está ao nível do detetor. Os espectrómetros EDXRF contêm um detetor que é capaz de medir as diferentes energias que a radiação característica transporta, e separá-las (dispersá-las) segundo as componentes pertencentes a cada elemento da amostra. Os espectrómetros WDXRF usam um cristal para dispersar as diferentes energias, difratando-as em direções diferentes.[33]

Nesta revisão foi focado o sistema EDXRF e seus componentes.

3.2.1 Raios-X e a sua interação com a matéria

Raios-X são ondas eletromagnéticas com um comprimento de onda entre os 0,01 e 10 nm, o que corresponde a energias entre os 0,125 e 125 KeV. A relação entre o comprimento de onda e a energia dos raios-X é dada pela equação de Planck

$$E = h \cdot \nu = \frac{h \cdot c}{\lambda} \quad (2.3)$$

em que E é a energia, λ é o comprimento de onda, ν é a frequência e $h \cdot c$ é o produto da constante de Planck com a velocidade da luz.

Existem três interações principais quando existe contacto entre raios-X e matéria: Fluorescência, Dispersão de Compton e Dispersão de Rayleigh (Figura 11).[33]

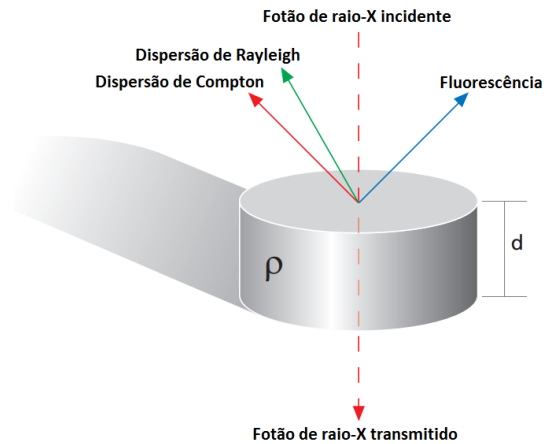


Figura 11 – Interações dos raios-X com matéria. (adaptado de [33])

Se um feixe de fótons raios-X é direcionado a uma placa de material, uma fração é transmitida através do material, outra é absorvida (originando a produção de radiação fluorescente) e outra é dispersa com perda de energia (Dispersão de Compton) ou sem perda de energia (Dispersão de Rayleigh). A fluorescência e a dispersão dependem da grossura (d), densidade (ρ) e composição do material, além da energia dos raios-X.[33]

3.2.2 Produção de radiação fluorescente característica

O modelo clássico de um átomo descreve-o como sendo composto por um núcleo positivamente carregado, rodeado por elétrons agrupados em orbitais. A mais interior é a K, seguida pelas orbitais L (L_I , L_{II} e L_{III}), orbitais M (M_I , M_{II} , M_{III} , M_{IV} , e M_V), etc. A energia de um elétron depende da orbital que ele ocupa e do elemento a que pertence. Quando um átomo é irradiado com fótons raios-X com energia suficiente, pode-lhe ser “roubado” um elétron (Figura 12).[33]

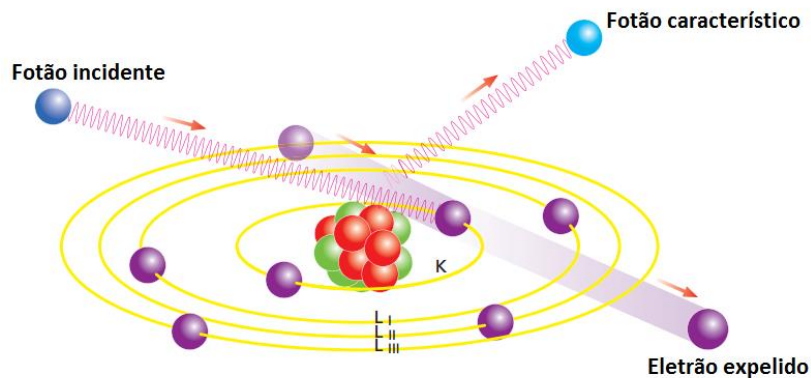


Figura 12 – Esquema da produção de radiação fluorescente característica. (adaptado de [33])

A expulsão de um elétron gera um espaço vazio inicial numa das orbitais, colocando o átomo num estado excitado com uma energia superior à do estado inicial. O átomo tende a regressar ao estado de menor energia e para isso um elétron de uma das camadas orbitais exteriores ocupa o espaço vazio deixado pelo elétron expelido. Assim, como os elétrons das camadas orbitais exteriores são mais energéticos que os das interiores, quando um elétron é transferido de uma orbital exterior para uma interior o excedente de energia pode ser emitido na forma de um fóton de raio-X.[35] Num espectro, este fenómeno é visto como uma linha. Cada átomo emite mais do que uma linha, porque diferentes espaços vazios iniciais podem ser produzidos e ocupados por elétrons de orbitais com energia diferente, originando fótons característicos também diferentes. O grupo total de linhas emitidas é característico para cada elemento.[33]

Para que um elétron seja expelido de um átomo, os raios-X incidentes têm que ter uma energia superior à de ligação do elétron. Se um elétron é expelido, a radiação incidente é absorvida e quanto maior a absorção, maior a fluorescência. Caso a energia seja alta demais, muitos fótons vão passar o átomo e apenas alguns elétrons serão retirados (Figura 13).[33]

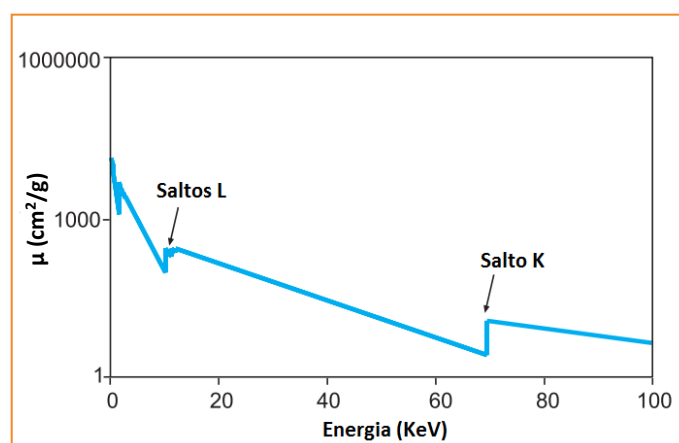


Figura 13 – Coeficiente de absorção mássica μ (cm^2/g) em função da Energia (KeV) de um fóton de raio-X. (adaptado de [33])

Assim, o rendimento máximo obtém-se quando a energia do fóton está imediatamente acima da energia de ligação para o elétron a ser expelido. Se a energia for imediatamente inferior à de ligação do elétron é visível na Figura 13 um salto, o que significa que a energia é demasiado baixa para expulsar elétrons de determinada orbital, mas também que é demasiado alta para expulsar elétrons de orbitais com energias inferiores.[33] Na Figura 13 está representado o salto K, correspondente à orbital K e os saltos L, correspondentes às orbitais L_I , L_{II} e L_{III} .

3.2.3 Absorção de radiação

O trajeto dos raios-X para os átomos da amostra não é direto. Têm de atravessar uma camada de separação (normalmente uma membrana muito fina) em que vai existir a absorção de uma parte da radiação incidente. A radiação característica produzida também vai ter de atravessar esta camada, sendo também parte dela absorvida. A absorção numa amostra aumenta com o aumento da trajetória da radiação, da densidade e do número atômico dos elementos na camada de separação, assim como com a diminuição da energia da radiação. A absorção pode ser tão elevada que os elementos mais interiores da amostra não são atingidos pela radiação ou a radiação característica não consegue abandonar a amostra e ser medida, sendo por isso só medidos os elementos mais perto da superfície.[33]

Às vezes, a radiação característica de um elemento produzida pela incidência de raios-X na amostra (Fluorescência primária) tem a capacidade de expelir átomos de outros elementos (Figura 14), causando também a emissão de radiação característica (Fluorescência secundária).[33]

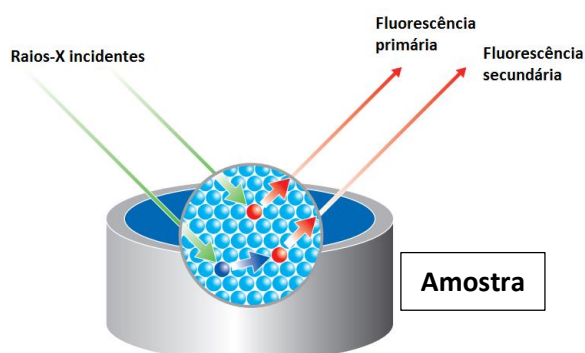


Figura 14 – Esquema da produção de fluorescência primária e secundária por incidência de raios-X. (adaptado de [33])

Um espectrómetro mede a soma das fluorescências primária e secundária sem as diferenciar, sendo que a secundária pode ter uma contribuição significativa, na ordem dos 20%. Também ocorrem fluorescências terciárias ou de grau superior, mas a contribuição destas na maioria dos casos é desprezável.[33]

3.2.4 Configuração ótica do EDXRF

Os sistemas EDXRF podem-se distinguir em dois tipos de configuração ótica, a 2D e a 3D (Figura 15). Na 2D, a radiação proveniente do tubo de raios-X irradia a amostra diretamente, sendo a radiação fluorescente característica medida num detetor dispersor de energia. Esta

configuração ótica é chamada de 2D porque o trajeto dos raios-X se dá apenas num plano (duas dimensões). Na 3D, é inserido um alvo secundário onde a radiação incide primeiro, produzindo radiação característica que de seguida irá irradiar a amostra. Nesta configuração ótica, o trajeto dos raios-X dá-se em dois planos perpendiculares, sendo por isso chamada de 3D.[33]

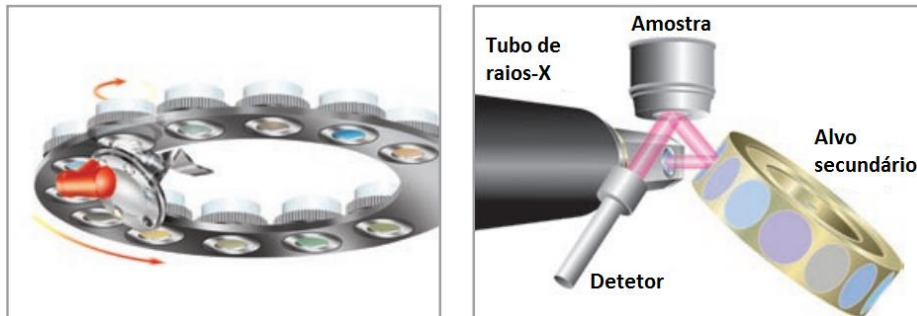


Figura 15 – Configurações óticas 2D (à esquerda) e 3D (à direita) em espectrómetros EDXRF. (adaptado de [33])

Estas duas configurações óticas produzem um espectro consideravelmente diferente (Figura 16). Em termos de redução do ruído de fundo a configuração 3D é muito mais vantajosa, pois acrescentando-se mais um plano na trajetória da radiação raio-X faz-se com que apenas a radiação característica (quase) monocromática produzida no alvo secundário incida sobre a amostra. Isto vai resultar numa redução muito significativa do ruído de fundo, pois a radiação dispersa do tubo de raios-X que não incide no alvo não vai conseguir atingir o detetor. Graças à grande diminuição no ruído de fundo em relação à 2D, picos de concentrações mais pequenas podem ser medidos em 3D. Uma desvantagem, contudo, é que as perdas de energia são relativamente superiores em 3D, porque a irradiação da amostra não é direta.[33]

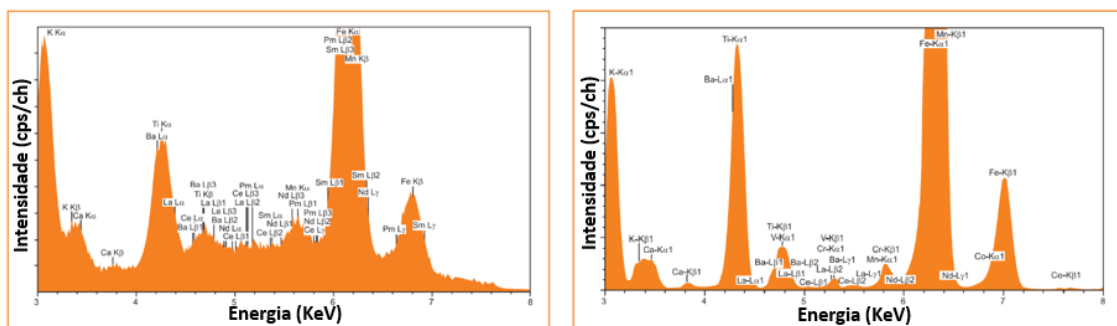


Figura 16 – Espectros típicos de Intensidade (Contagens por segundo e por canal) em função da Energia (KeV) em amostras de solo com um EDXRF 2D (à esquerda) e com um 3D (à direita). (adaptado de [33])

3.2.5 Tubos de raios-X

Um tubo de raios-X geralmente contém um filamento e um ânodo (alvo) colocados em posições opostas num dispositivo em vácuo (Figura 17). Uma voltagem elevada (20 a 100 kV) é aplicada entre o filamento e o ânodo, acelerando os eletrões do filamento em direção ao ânodo. Após o atingirem, são desacelerados havendo emissão de radiação raio-X *Bremsstrahlung*. A energia e intensidade dos raios-X emitidos é uniforme, mas um espectro de energias, cada uma com a sua intensidade, é emitido. Este é conhecido como espectro contínuo, porque é uma banda contínua de energias emitidas.[36]

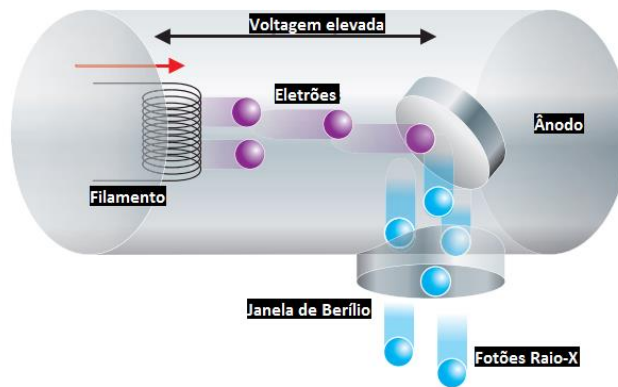


Figura 17 – Configuração de um tubo de Raios-X com janela lateral de berílio (adaptado de [33])

O espectro contínuo produzido num tubo de raios-X é determinado pela composição elementar do ânodo, voltagem aplicada e corrente elétrica (Figura 18).

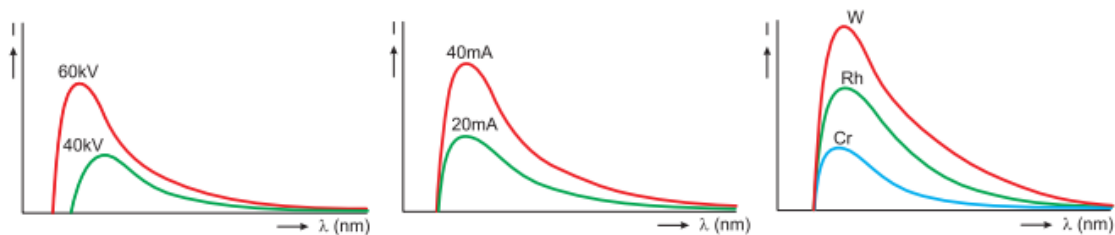


Figura 18 – Espectro contínuo de um tubo de raios-X consoante a voltagem (esquerda), corrente elétrica (no meio) e composição elementar do ânodo.[33]

Analisando a Figura 18, vemos que aumentando a voltagem e corrente, aumenta-se a intensidade da radiação produzida pelo tubo de raios-X, diminuindo o comprimento de onda (no caso do aumento de voltagem). Mudando a composição elementar do ânodo entre W-Tungstênio (Número atómico 74), Rh-Ródio (Número atómico 45) e Cr-Crómio (Número atómico 24), verifica-se pelo gráfico à esquerda na Figura 18 que a intensidade da radiação produzida

pelo tubo de raios-X aumenta consoante o aumento no peso (número atômico) do elemento que compõe o ânodo.

3.2.6 Alvos secundários

Nos espectrómetros EDXRF 3D a radiação que atinge a amostra é emitida por um alvo secundário. Os alvos secundários podem ser fluorescentes, Barkla ou Bragg. Os alvos fluorescentes são maioritariamente compostos por elementos pesados, que quando irradiados pela radiação raio-X proveniente do ânodo emitem fluorescência raio-X. Ocorre também, em muito menor proporção, dispersão da radiação no alvo. Normalmente os espectrómetros com este tipo de alvos secundários têm vários diferentes, que podem ser definidos para se alcançar a fluorescência ótima para o(s) elemento(s) de interesse na amostra que está a ser lida. Os alvos Barkla são compostos por elementos leves como Al_2O_3 e B_4C que dispersam a radiação proveniente do tubo de raios-X, utilizando-a para excitar a amostra (normalmente usam-se para ler elementos pesados). Finalmente, os alvos Bragg são cristais que refletem apenas uma energia específica na direção em que se encontra a amostra, eliminando a difração de outra radiação em direção à amostra. São usados para reduzir o ruído de fundo e melhorar o limite de deteção.[33,37]

3.2.7 Detetor e Analisador Multicanal

Em EDXRF o tipo de detetor mais utilizado é o de estado sólido dispersor de energia (Figura 19). É construído com um corpo de sílica, germânio ou de outro material semiconductor. A janela de berílio permite a entrada dos fotões raio-X no detetor e nessa entrada existe uma camada “morta”, existindo no fundo oposto um prato de recolção. Os fotões passam através da janela e penetram no corpo do detetor para produzir pares eletrão-lacuna. O número de eletrões aumenta com o aumento da energia dos fotões incidentes.[33]

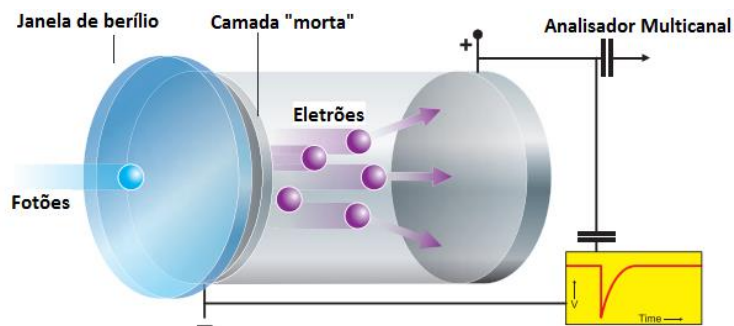


Figura 19 – Detetor de estado sólido dispersor de energia. (adaptado de [33])

Os elétrons são atraídos para o fundo do detetor pela existência de uma voltagem alta (1500 V) entre a camada “morta” e o fundo do detetor. Quando atingem o fundo, o potencial cai e produzem um pulso negativo, sendo a profundidade deste proporcional ao número de elétrons e , por isso, à energia da radiação incidente no detetor. Os pulsos são depois amplificados e contados pelo analisador multicanal. As propriedades mais importantes dos sistemas de detecção são a resolução, a sensibilidade e a dispersão. A resolução é a capacidade de um sistema de detecção para distinguir diferentes níveis de energia, sendo tanto maior quanto maior for o número de níveis de energia diferentes que consiga distinguir. A sensibilidade indica quão eficientemente os fótons incidentes são contados. Um sistema de detecção com boa sensibilidade tem um bom rácio de número de pulsos em relação ao número de fótons incidentes. Finalmente, a dispersão indica a capacidade do sistema de detecção para separar de maneira eficiente raios-X de diferentes energias.[33,38]

3.2.8 Picos de escape e picos *pile-up*

Os detetores sofrem dois tipos principais de perturbações nas leituras: os picos de escape e os picos *pile-up*. Os átomos presentes no detetor também emitem radiação característica, o que faz com que os fótons raio-X incidentes percam uma parte da energia. Assim, o detetor além de contar os fótons com a energia inicial, também vai contar uma fração com energia mais pequena. No espectro, isto resulta em dois picos: o principal e o de escape. Já os picos *pile-up* acontecem quando dois fótons entram simultaneamente no detetor. Ambos produzem uma nuvem eletrónica, mas estas não vão ser distinguidas no sistema de detecção, sendo detetada uma energia equivalente à soma dos dois fótons.[39]

Estes dois tipos de perturbação podem interferir com os outros picos do espectro, ou levar a conclusões erradas quanto aos elementos presentes na amostra.

3.2.9 Filtros

Os filtros são colocados entre a fonte de raios-X e a amostra. Têm a utilidade de reduzir a intensidade de linhas interferentes e ruído de fundo, aumentando a proporção sinal-ruído.[39]

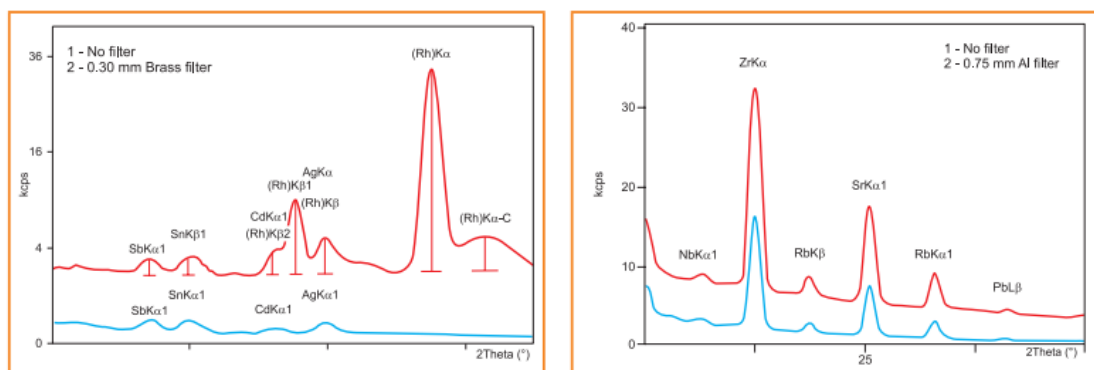


Figura 20 – Efeito dos filtros de bronze e alumínio no espectro obtido no detector.[33]

Na Figura 20 (à esquerda) está representado o efeito de um filtro de bronze de 300 μm . Comparando o espectro sem filtro (a vermelho) com o espectro após aplicação do filtro (a azul) é visível a filtragem das linhas espectrais provenientes do tubo de raio-X e ruído de fundo. Já o filtro aplicado no espectro da direita que é de alumínio com uma espessura de 750 μm , é usado para diminuir o ruído de fundo e melhorar o limite de deteção. Causa uma diminuição proporcional nas contagens por segundo (kcps) em cada pico, evitando uma saturação do detetor por intensidades demasiado elevadas.

3.2.10 Cristais de difração e Colimadores

Os cristais de difração são usados para separar a radiação característica proveniente de uma amostra. Podem ser de origem natural como cristais de fluoreto de lítio e de germânio, ou uma pilha de camadas cristalinas artificiais. Para se cobrirem todos os elementos é necessário mais do que um tipo de cristal.[40]

Um colimador é um conjunto de placas paralelas e tem a função de obter um raio-X paralelo que atinja o cristal exatamente no ângulo pretendido. O colimador primário é colocado entre a amostra e o cristal e um colimador secundário pode ser colocado entre o cristal e o detetor.[33]

3.2.11 Máscaras e Spinner

Uma máscara em espectrómetros EDXRF são pratos metálicos com um buraco. Quando a amostra é irradiada, também o copo onde se encontra vai reagir aos raios-X incidentes e produzir radiação característica. A máscara é colocada entre a amostra e o sistema de deteção para que apenas a amostra seja visível para o detetor.[33]

O *spinner* é um sistema mecânico que por interação com a máscara gira a amostra aquando a leitura. Isto vai resultar na anulação de efeitos de não homogeneidade e arranhões, que afetam as leituras.[33]

4. Materiais e Métodos

Para o delinear da estratégia de calibração do método alternativo (Espectrometria por XRF), seguiram-se de forma fiel as diretorias internas da Nestlé, que são transversais a todas as unidades de produção da empresa. O pretendido era que os modelos de calibração criados no espectrómetro de XRF, no decorrer deste trabalho, fossem capazes de medir a quantidade de cálcio, ferro e zinco em PMs 75, 76 e 98, com diferenças mínimas em relação ao que é medido pelo método de referência (FAAS).

4.1 Seleção de amostras

Para se obter uma calibração precisa, foi importante uma seleção cuidada das amostras a utilizar. As amostras devem ser representativas da composição, variabilidade estrutural e concentração dos produtos que se querem analisar em condições de rotina. Neste caso, as amostras que foram usadas são representativas da composição que normalmente as PMs 75, 76 e 98 têm, que é dada pelas receitas das mesmas. Estas têm um valor mínimo, ótimo e máximo para as concentrações de cálcio, ferro e zinco. Esta informação foi usada para decidir quais os pontos de concentração a usar em cada curva de calibração.

Uma das condições principais nas diretorias internas da Nestlé para uma boa calibração é que as amostras de calibração devem cobrir toda a gama de concentrações, incluindo os pontos máximos e mínimos para cada elemento e PM. Assim, não foi suficiente usar apenas as amostras da linha de produção, tendo sido também preparadas amostras experimentais de PMs 75, 76 e 98, no laboratório.

Preparação de amostras experimentais

Na produção de amostras experimentais para a calibração, utilizaram-se todos os componentes das receitas de cada uma das PMs. A pesagem de cada componente foi feita em copos metálicos do homogeneizador *Retsch Grindomix GM200*, começando pelos componentes presentes em maior concentração, de modo a promover uma melhor homogeneização. Os ingredientes foram pesados de modo a obter a concentração pretendida de cada elemento, segundo a receita de cada PM e 100 g finais de amostra experimental. Após pesagem, as amostras foram homogeneizadas em duas etapas a 6000 rpm, durante 60 s cada e colocadas em sacos metálicos que foram posteriormente identificados e armazenados.

4.2 Procedimento experimental para a quantificação de cálcio, ferro e zinco em PMs por FAAS

4.2.1 Reagentes usados e soluções preparadas

Para a técnica FAAS, usam-se os reagentes e soluções da Tabela 6.

Tabela 6 – Reagentes usados e soluções preparadas para a FAAS.

| Reagentes | Soluções preparadas |
|--|--|
| Solução padrão de cálcio Merck 1000 mg/L | Solução <i>stock</i> de cálcio (a 100 µg/ml) |
| Solução padrão de Ferro Merck 1000 mg/L | Solução <i>stock</i> de ferro e zinco (a 100 e 20 µg/ml, respetivamente) |
| Solução padrão de Zinco Merck 1000 mg/L | |
| Ácido nítrico concentrado 65% (v/v) | Soluções de calibração de cálcio |
| Peróxido de hidrogénio a 30% (v/v) | Soluções de calibração de ferro e zinco |
| Óxido de Lantânio Merck | |

Preparação de soluções:

- **Solução *stock* de cálcio:** Num balão volumétrico de vidro de 50 ml, pipetam-se 5 ml de solução padrão de cálcio Merck e perfaz-se o restante volume com água ultra-pura;
- **Solução *stock* de ferro e zinco:** Num balão volumétrico de vidro de 50 ml, pipetam-se 5 ml de solução padrão de ferro e 1 ml de solução padrão de zinco Merck, perfazendo-se o restante volume com água ultra-pura;
- **Soluções de calibração de cálcio:** Numa série de 6 balões volumétricos de vidro de 100 ml pipetam-se, respetivamente, 0-0,1-0,2-0,5-1-2,0 ml de solução *stock* de cálcio. Adiciona-se 1 ml de solução de lantânio e perfaz-se o restante volume dos balões com água ultra-pura;
- **Soluções de calibração de ferro e zinco:** Numa série de 6 balões volumétricos de vidro de 100 ml pipetam-se, respetivamente, 0-0,5-1,0-2,0-5,0-10 ml da solução *stock* de ferro e zinco. Perfaz-se o restante volume dos balões com água ultra-pura.

4.2.2 Preparação das amostras

As amostras de PM (de linha ou experimentais) a serem analisadas por FAAS requerem uma etapa prévia de hidrólise ácida com ácido nítrico a 65% (v/v).

Para o efeito, pesam-se 0,5 g de PM (em duplicado) para vasos de tetrafluormetaxil. Adicionam-se a cada vaso 5 ml de ácido nítrico a 65% (v/v) e 0,5 ml de peróxido de hidrogénio a 30% (v/v). Vedam-se os vasos em recipientes cerâmicos próprios e colocam-se a digerir no equipamento de microondas MLS-1200, cujo programa está especificado na Figura 21 e na Tabela 7.

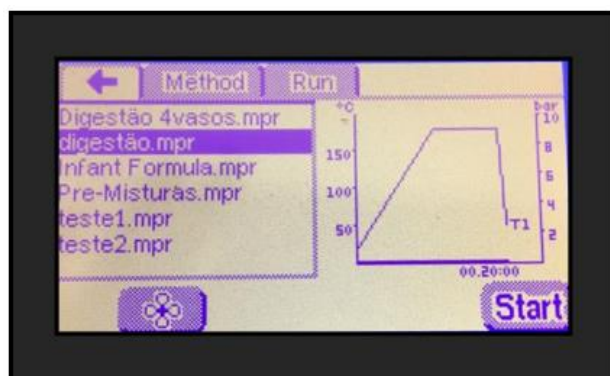


Figura 21 – Fotografia ao visor do microondas MLS-1200, utilizado na preparação de amostras para FAAS.

Tabela 7 – Etapas do programa de digestão e respetivas características (potência do microondas, temperatura e tempo de duração).

| Etapa | Potência do Microondas (W) | Temperatura (°C) | Tempo (min) |
|-------|----------------------------|------------------|-------------|
| 1 | 700 | 25 a 180°C | 12 |
| 2 | 700 | 180°C | 10 |
| 3 | 0 | 180°C a 50°C | 1 |

Após a digestão, espera-se cerca de 30 min antes de retirar os recipientes cerâmicos e abrir os vasos, para permitir o arrefecimento. Findo este tempo, transfere-se o conteúdo dos vasos para balões volumétricos de 50 ml, sendo posteriormente o volume dos mesmos aferido usando água ultra pura. Para a análise das amostras por FAAS, a concentração de minerais de cada amostra deve estar localizada numa zona central de cada curva de calibração (cálcio, ferro e zinco). Assim, dilui-se cada amostra em balões volumétricos de 100 ml, considerando-se o volume inicial igual a 50 ml, de modo a que a concentração de cada mineral a ser lido esteja dentro da gama ótima. Para as leituras de cálcio, adiciona-se também 1 ml de solução de lantânio a 1% (m/v). Os balões de 100 ml preparados são usados diretamente para a análise por FAAS.

4.2.3 Análise das amostras

Terminada a preparação e diluição das amostras, prepara-se o espectrómetro para as leituras. Começa-se por ligar o aparelho de FAAS e, posteriormente, as lâmpadas de cátodo ôco de cálcio, ferro e zinco e o corretor de ruído de fundo (no caso do ferro e zinco).

Tabela 8 – Configurações de leitura em FAAS para cálcio, ferro e zinco.

| Elemento | Comprimento de onda (nm) | Corretor de ruído de fundo |
|----------|--------------------------|----------------------------|
| Cálcio | 422,7 | Desligado |
| Ferro | 248,3 | Ligado |
| Zinco | 213,9 | Ligado |

Quando a intensidade da lâmpada estabilizou (após cerca de 25 min) ligou-se as correntes de ar e acetileno, a chama e o sistema de exaustão. Deixa-se a chama estabilizar durante 15 min antes de qualquer leitura. Segue-se a construção da curva de calibração usando as soluções de calibração preparadas anteriormente, que permite através da absorvância medida pelo FAAS, saber a concentração em amostras para o analito cuja curva de calibração está construída no método.

O espectrómetro faz três leituras consecutivas de cada amostra e de seguida a média desses valores, que é apontada pelo operador. A concentração do analito na amostra (em mg de analito por 100 g de amostra) foi calculada usando a equação

$$\text{Concentração de analito} \left(\frac{\text{mg}}{100\text{g}} \right) = \frac{[(C \times D) - B] \times V}{M \times 10} \quad (3.1)$$

em que B é a concentração de analito na solução de Branco em $\mu\text{g/ml}$, C é a concentração de analito obtido na leitura da amostra em $\mu\text{g/ml}$, D é o fator de diluição, V é o volume da amostra inicial em ml, M é a massa da amostra em g e 10 é o fator de conversão de g/g para mg/100g.

4.3 Procedimento experimental para a quantificação de cálcio, ferro e zinco em PMs por Espectrometria de XRF

4.3.1 Preparação dos copos amostrais

Os copos onde se colocam as amostras para leitura pelo espectrómetro de XRF têm de ser previamente montados, de uma maneira muito simples. Cada um possui três peças de plástico (dois cilindros de bases abertas, tendo um deles diâmetro ligeiramente inferior ao outro, de modo a que possam encaixar, e uma tampa do mesmo material) e um milar que normalmente é de polipropileno.



Figura 22 – Preparação de um copo amostral para o espectrómetro de XRF.(adaptado de [41])

Começa-se por colocar o cilindro de plástico de maior diâmetro na base para preparação de copos. Põe-se de seguida um milar de polipropileno centrado nesse cilindro (Figura 22). Encaixa-se o cilindro de diâmetro mais pequeno no de maior diâmetro, empurrando o milar e esticando-o ao máximo (sem rasgar). O copo amostral está assim pronto a receber a amostra de PM.

Para isso, ainda sem remover a base de preparação de copos, pesam-se 6 g da amostra a ser lida pelo espectrómetro de XRF e finalmente coloca-se a tampa no copo e removeu-se a base de preparação de copos. Todas as leituras neste equipamento são feitas em triplicado.

Condições de operação do equipamento e leituras

O equipamento de XRF usado para as leituras foi o espectrómetro EDXRF Minipal 4 da PANalytical. Através do software Minipal/Minimate, estabelecem-se as condições de operação

(Tabela 9) como o código do canal, nome da condição, voltagem, corrente, filtro, meio e tempo de análise.

Tabela 9 – Condições de operação do espectrômetro de XRF usadas para a leitura de cálcio, ferro e zinco.

| Elemento | Código do canal | Corrente (μ A) | Nome da condição | Voltagem (kV) | Filtro | Meio | Tempo de análise (s) |
|---------------|-----------------|---------------------|------------------|---------------|----------|------|----------------------|
| Cálcio | Ca | 250 | <K-Zn> | 20 | Alumínio | Ar | 120 |
| Ferro | Fe | | | | | | |
| Zinco | Zn | 120 | | | | | |

Definidas as condições de operação, identificam-se as amostras a ser lidas no software Minipal/Minimate, introduzindo o valor de concentração de cada elemento que foi obtido pelo método de referência anteriormente referido (FAAS). Os copos amostrais podem então ser inseridos nas máscaras do disco do espectrômetro e iniciar-se a leitura. O sistema faz uma previsão por XRF da concentração de cálcio, ferro e zinco em cada amostra (em contagens por segundo – cps) e compara-a com o valor anteriormente obtido pelo método de referência. Foi este o método com que, progressivamente, se foi construindo as curvas de calibração presentes no capítulo seguinte.

5. Resultados e Discussão

Para a calibração e aceitação de um método alternativo a ser utilizado na Nestlé, existem diversos critérios da qualidade dessa mesma calibração que têm de ser respeitados. Isto é de extrema importância para a empresa, que segundo diretorias internas estabeleceu sete critérios que são transversais à calibração de qualquer método alternativo.

Tabela 10 – Critérios Nestlé para a aceitação de um modelo de calibração.

| Critério | Indicador de Performance | Requisito |
|----------|---|---|
| 1 | Avaliação visual da regressão linear | Os pontos devem cobrir, tão uniformemente quanto possível, toda a gama de concentração. |
| 2 | Avaliação visual do gráfico residual | Os pontos devem estar distribuídos de maneira uniforme à volta do eixo das abcissas. |
| 3 | Coeficiente de determinação (R^2) | O R^2 tem que ser superior a 0,850. |
| 4 | Erro padrão da calibração (SEC – <i>Standard Error of Calibration</i>) | Tão baixo quanto possível. |
| 5 | Erro padrão da predição (SEP – <i>Standard Error of Prediction</i>) | $SEP/SEC \leq 1,5$ |
| 6 | Intervalo de confiança à volta do declive | O intervalo de confiança à volta do declive tem de conter o valor 1. |
| 7 | Intervalo de confiança à volta da interseção com eixo das ordenadas | O intervalo de confiança à volta da interseção tem de conter o valor 0. |

Para o cálculo de todos os parâmetros das curvas de calibração e análise estatística, utilizou-se a poderosa ferramenta ESTER Q-Stat.net, que é utilizada a nível mundial pela empresa para a verificação, validação e monitorização de modelos de calibração. A introdução de dados no Q-Stat é feita retirando do software Minipal/Minimate do espectrómetro de XRF o ficheiro que dá o valor de referência (obtido por FAAS) e o valor alternativo (obtido por leitura no XRF) para cada replicado de cada amostra. No total, construíram-se sete modelos de calibração (Ca75, Ca7698, Fe75, Fe7698, Zn75, Zn76 e Zn98), descritos e avaliados nos sub-capítulos seguintes. Os resultados de calibração apresentam os valores médios dos ensaios feitos em triplicado, sendo que todos os resultados que foram utilizados para a construção dos modelos estão em anexo (Anexo A1, A2 e A3).

5.1 Curvas de calibração para a determinação de cálcio em pré-misturas (por espectrometria de XRF)

O ideal para a construção de uma curva de calibração de cálcio, seria que a mesma fosse capaz de determinar a concentração (c) de cálcio em qualquer uma das três PMs em estudo (75, 76 e 98). Infelizmente, por estas PMs terem matrizes diferentes, isto não foi possível, tendo-se separado a PM 75 das restantes duas. Avaliou-se a concentração típica de cálcio nas três PMs (Tabela 11) e selecionaram-se amostras para calibração em conformidade.

Tabela 11 – Concentrações de cálcio típicas especificadas na receita de cada PM.

| PM | Concentração de cálcio esperada ($\% \frac{m_{\text{cálcio}}}{m_{\text{amostra}}}$) | | |
|----|---|------|--------|
| | Mínima | Alvo | Máxima |
| 75 | 8,8 | 11,8 | 14,7 |
| 76 | 20,6 | 27,5 | 34,3 |
| 98 | 15,6 | 20,8 | 26,0 |

Leram-se no total 48 amostras diferentes (N=48), 22 para construção da curva de calibração Ca75 (Figura 23) e 26 para a Ca7698 (Figura 24), das quais 20 eram amostras de linha e as restantes 28 amostras experimentais. Isto correspondeu a 144 replicados por espectrometria de XRF e 96 replicados por FAAS.

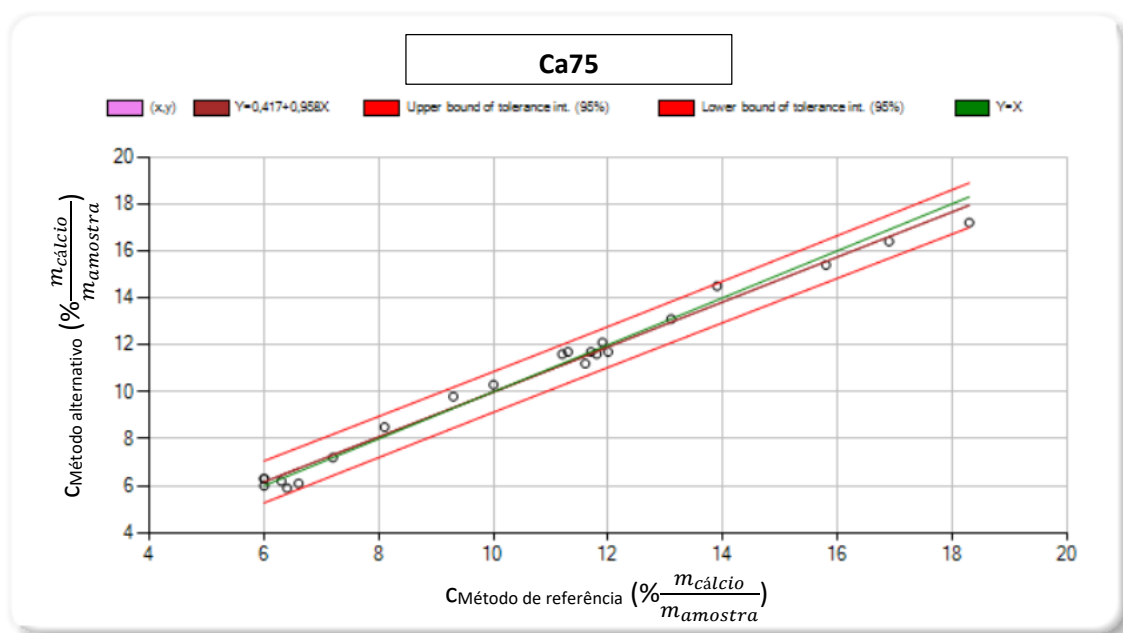


Figura 23 – Curva de calibração de cálcio para a PM 75 gerada pelo *software QStat*. Estão representados os valores médios de concentração de cálcio obtidos pelo método alternativo em função dos valores médios de concentração obtidos pelo método de referência, para cada uma das 22 amostras. São visíveis também os limites de confiança de 95% (a vermelho) e a regressão linear dos pontos obtidos (a castanho).

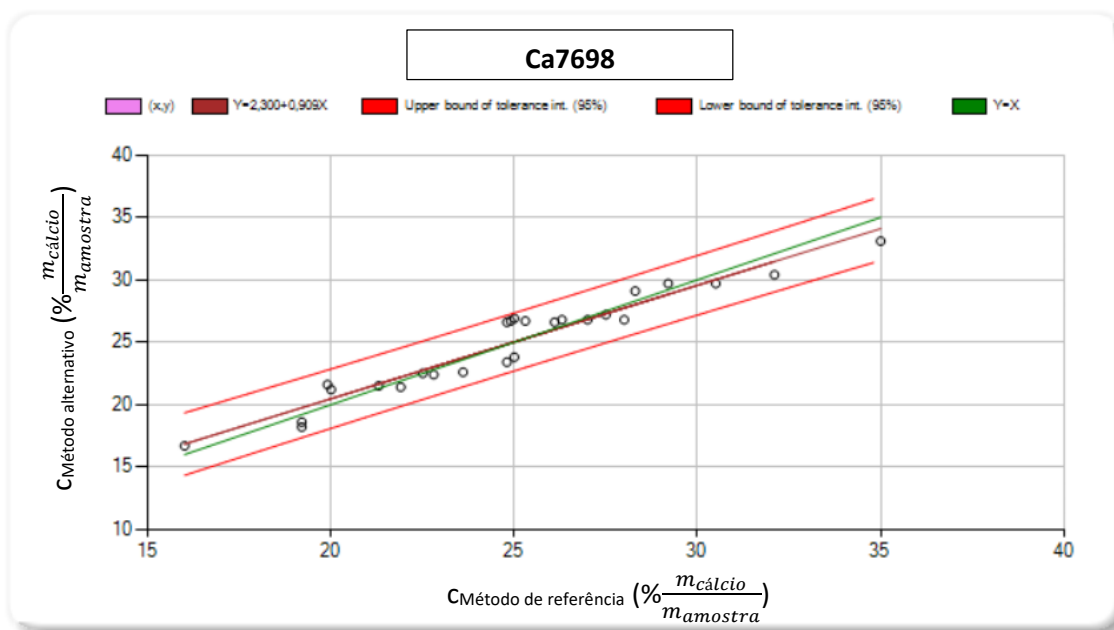


Figura 24 – Curva de calibração de cálcio para as PMs 76 e 98, gerada pelo *software* QStat. Estão representados os valores médios de concentração de cálcio obtidos pelo método alternativo em função dos valores médios de concentração obtidos pelo método de referência, para cada uma das 26 amostras. São visíveis também os limites de confiança de 95% (a vermelho) e a regressão linear dos pontos obtidos (a castanho).

Conformidade com os critérios de Qualidade da Nestlé

Seguiu-se a verificação da conformidade dos modelos criados (Tabela 12) com os 7 critérios da Nestlé.

Tabela 12 – Características dos modelos de calibração de cálcio obtidos e respetivas regressões lineares.

| Curva de calibração | Gama de concentrações (% $\frac{m_{cálcio}}{m_{amostra}}$) | | Regressão linear | N | R ² |
|---------------------|--|------|--|----|----------------|
| | Mín. | Máx. | | | |
| Ca75 | 6,3 | 18,3 | $\text{CMétodo alternativo } \left(\% \frac{m_{cálcio}}{m_{amostra}}\right) = 0,958 \times \text{CMétodo de referência } \left(\% \frac{m_{cálcio}}{m_{amostra}}\right) + 0,417$ | 22 | 0,988 |
| Ca7698 | 16,0 | 35,0 | $\text{CMétodo alternativo } \left(\% \frac{m_{cálcio}}{m_{amostra}}\right) = 0,909 \times \text{CMétodo de referência } \left(\% \frac{m_{cálcio}}{m_{amostra}}\right) + 2,300$ | 26 | 0,929 |

Em relação à avaliação visual do gráfico e regressão linear (critérios 1 e 2), verificou-se que os modelos de calibração têm gamas de concentração de cálcio mais amplas e que incluem as gamas de concentrações de cálcio nas receitas das PMs 75, 76 e 98 (Tabela 11), distribuindo-

se os pontos de maneira satisfatória ao longo do eixo das abcissas. Os coeficientes de determinação (R^2) obtidos foram de 0,988 para o modelo Ca75 e 0,929 para o modelo Ca7698 estando estes valores acima do requerido pelo critério 3 ($R^2 \geq 0,850$). Os valores de SEC e SEP obtidos foram, respetivamente, 0,406% e 0,417% para a Ca75 e 1,104% e 1,130% para a Ca7698, sendo por isso $SEP_{Ca75}/SEC_{Ca75} = 1,02 \leq 1,5$ e $SEP_{Ca7698}/SEC_{Ca7698} = 1,03 \leq 1,5$, cumprindo-se nas duas curvas os critérios 4 e 5. Fez-se uma análise por *QStat*, com um intervalo de confiança superior e inferior de 95%, e obteve-se os valores mínimo, central e máximo à volta do declive e da intersecção com o eixo das ordenadas para os modelos de calibração Ca75 e Ca7698 (Tabela 13).

Tabela 13 – Intervalos de confiança à volta do declive e das intersecções dos modelos com o eixo das ordenadas.

| | Mínimo | Central | Máximo | Decisão |
|---|--------|---------|--------|----------|
| Modelo de calibração Ca75 | | | | |
| Declive | 0,908 | 0,958 | 1,008 | Inclui 1 |
| Intersecção com eixo das ordenadas | -0,139 | 0,417 | 0,973 | Inclui 0 |
| Modelo de calibração Ca7698 | | | | |
| Declive | 0,803 | 0,909 | 1,014 | Inclui 1 |
| Intersecção com eixo das ordenadas | -0,360 | 2,300 | 4,960 | Inclui 0 |

Assim, os intervalos de confiança à volta dos declives incluem 1 e à volta das intersecções com os eixos das ordenadas incluem 0, tendo sido então garantida a conformidade dos modelos de calibração Ca75 e Ca7698 com os 7 critérios base da Nestlé.

5.2 Curvas de calibração para a determinação de ferro em PMs (por espectrometria de XRF)

À semelhança do que aconteceu para o cálcio, separou-se a PM 75 das PMs 76 e 98 na calibração do método alternativo. Avaliou-se a concentração típica de ferro nas três PMs (Tabela 14) e selecionaram-se amostras para calibração em conformidade.

Tabela 14 – Concentrações de ferro típicas especificadas na receita de cada PM.

| PM | Concentração de ferro esperada ($\% \frac{m_{ferro}}{m_{amostra}}$) | | |
|----|---|------|--------|
| | Mínima | Alvo | Máxima |
| 75 | 0,79 | 1,05 | 1,31 |
| 76 | 1,10 | 1,46 | 1,83 |
| 98 | 1,60 | 2,14 | 2,67 |

Leram-se no total 43 amostras diferentes (N=43), 18 para construção da curva de calibração Fe75 (Figura 25) e 25 para a Fe7698 (Figura 26), das quais 16 foram amostras de linha e as restantes 27 amostras experimentais. Isto correspondeu a 129 replicados por espectrometria de XRF e 86 replicados por FAAS.

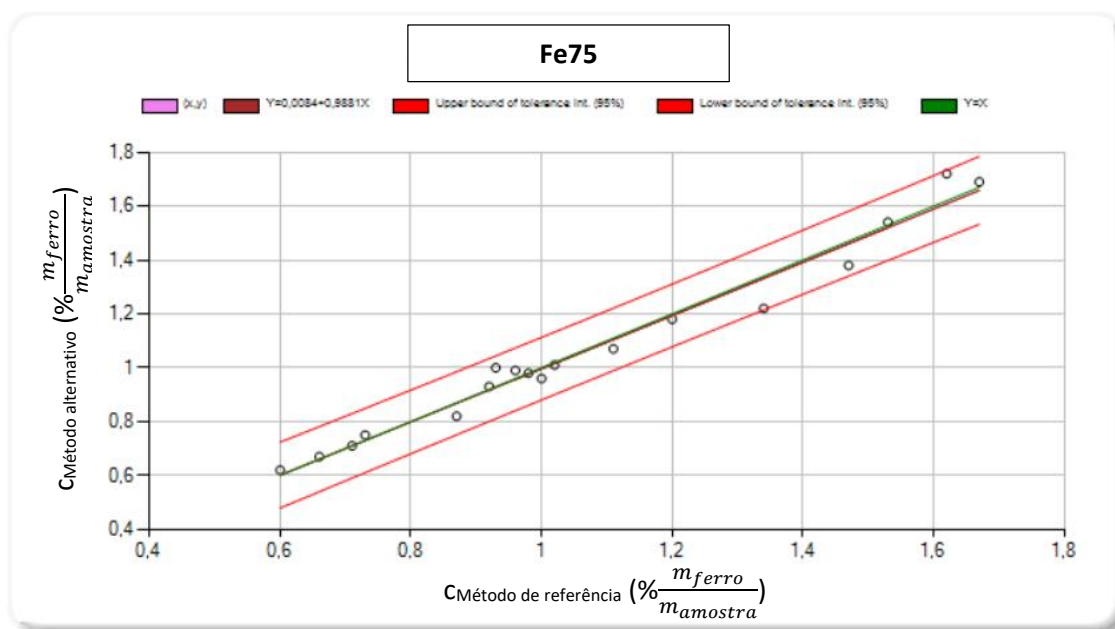


Figura 25 – Curva de calibração de ferro para a PM 75 gerada pelo *software* QStat. Estão representados os valores médios de concentração de ferro obtidos pelo método alternativo em função dos valores médios de concentração obtidos pelo método de referência, para cada uma das 18 amostras. São visíveis também os limites de confiança de 95% (a vermelho) e a regressão linear dos pontos obtidos (a castanho).

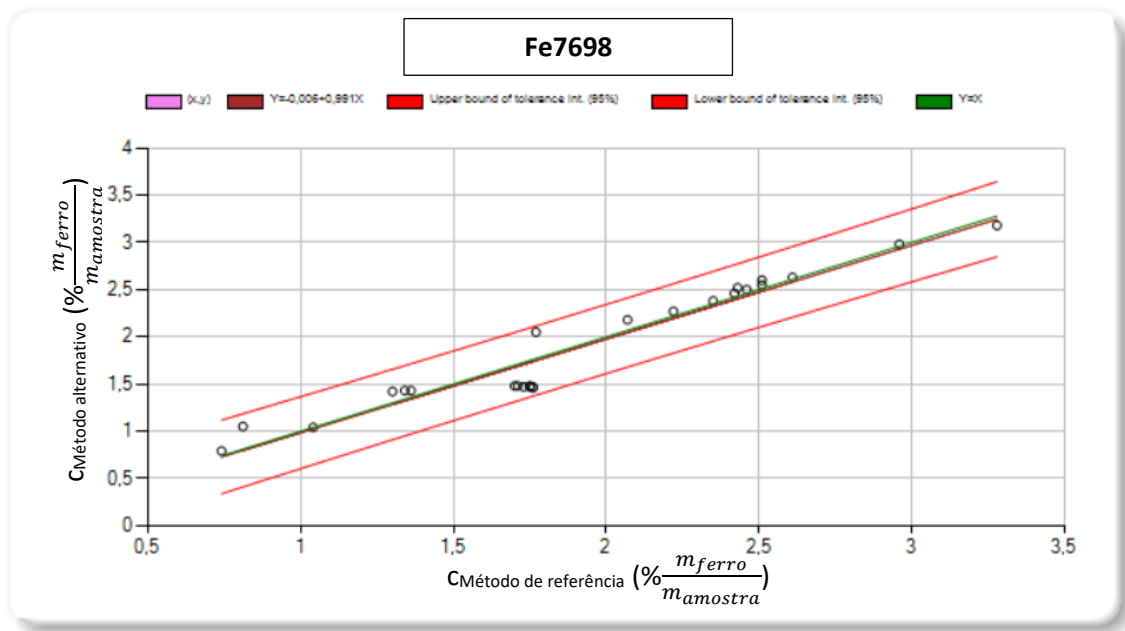


Figura 26 – Curva de calibração de ferro para as PMs 76 e 98 gerada pelo *software* QStat. Estão representados os valores médios de concentração de ferro obtidos pelo método alternativo em função dos valores médios de concentração obtidos pelo método de referência, para cada uma das 25 amostras. São visíveis também os limites de confiança de 95% (a vermelho) e a regressão linear dos pontos obtidos (a castanho).

Conformidade com os critérios de Qualidade da Nestlé

Seguiu-se a verificação da conformidade dos modelos criados (Tabela 15) com os 7 critérios da Nestlé.

Tabela 15 – Características dos modelos de calibração de ferro obtidos e respetivas regressões lineares.

| Curva de calibração | Gama de concentrações (% $\frac{m_{ferro}}{m_{amostra}}$) | | Regressão linear | N | R ² |
|---------------------|---|------|--|----|----------------|
| | Mín. | Máx. | | | |
| Fe75 | 0,6 | 1,67 | $CMétodo\ alternativo\ (\% \frac{m_{ferro}}{m_{amostra}}) = 0,9881 \times CMétodo\ de\ referência$ $(\% \frac{m_{ferro}}{m_{amostra}}) + 0,0084$ | 18 | 0,976 |
| Fe7698 | 0,74 | 3,28 | $CMétodo\ alternativo\ (\% \frac{m_{ferro}}{m_{amostra}}) = 0,991 \times CMétodo\ de\ referência$ $(\% \frac{m_{ferro}}{m_{amostra}}) - 0,006$ | 25 | 0,933 |

Em relação à avaliação visual do gráfico e regressão linear (critérios 1 e 2), verificou-se que os modelos de calibração tem gamas de concentração de ferro mais amplas e que incluem as gamas de concentrações de ferro nas receita de PM 75, 76 e 98 (Tabela 14), distribuindo-se

os pontos de maneira satisfatória ao longo do eixo das abcissas. Os coeficientes de determinação (R^2) obtidos foram de 0,976 para o modelo Fe75 e 0,933 para o modelo Fe7698 estando estes valores acima do requerido pelo critério 3 ($R^2 \geq 0,850$). Os valores de SEC e SEP obtidos foram, respetivamente, 0,0533% e 0,0506% para a Fe75 e 0,174% e 0,168% para a Fe7698, sendo por isso $SEP_{Fe75}/SEC_{Fe75} = 0,95 \leq 1,50$ e $SEP_{Fe7698}/SEC_{Fe7698} = 0,97 \leq 1,50$, cumprindo-se nas duas curvas os critérios 4 e 5. Fez-se uma análise por *QStat*, com um intervalo de confiança superior e inferior de 95%, e obteve-se os valores mínimo, central e máximo à volta do declive e da intersecção com o eixo das ordenadas para os modelos de calibração Fe75 e Fe7698 (Tabela 16).

Tabela 16 – Intervalos de confiança à volta do declive e das intersecções dos modelos com o eixo das ordenadas.

| | Mín. | Central | Máx. | Decisão |
|---|--------|---------|-------|----------|
| Modelo de calibração Fe75 | | | | |
| Declive | 0,906 | 0,988 | 1,071 | Inclui 1 |
| Intersecção com eixo das ordenadas | -0,084 | 0,008 | 0,101 | Inclui 0 |
| Modelo de calibração Fe7698 | | | | |
| Declive | 0,877 | 0,991 | 1,106 | Inclui 1 |
| Intersecção com eixo das ordenadas | -0,239 | -0,006 | 0,226 | Inclui 0 |

Assim, os intervalos de confiança à volta dos declives incluem 1 e à volta das intersecções com os eixos das ordenadas incluem 0, tendo sido então garantida a conformidade dos modelos de calibração Fe75 e Fe7698 com os 7 critérios base da Nestlé.

5.3 Curvas de calibração para a determinação de zinco em PMs (por espectrometria de XRF)

Ao contrário do que aconteceu para o cálcio e zinco, em que duas das PMs (76 e 98) puderam ser agrupadas numa só curva de calibração, para a quantificação do zinco foi necessário separar as três. O motivo para isto prende-se pela menor quantidade de zinco que se encontra nas PMs, dificultando a existência de um modelo que consiga quantificar de maneira exata o teor em PMs diferentes porque o efeito da matriz das amostras é superior. Assim, foram

criados três modelos distintos: Zn75, Zn76 e Zn98. Avaliou-se a concentração típica de zinco nas PMs 75, 76 e 98 (Tabela 17) e selecionaram-se amostras para calibração em conformidade.

Tabela 17 – Concentrações de zinco típicas especificadas na receita de cada PM.

| PM | Concentração de zinco esperada ($\frac{mg\ Zinco}{100g\ amostra}$) | | |
|----|--|------|--------|
| | Mínima | Alvo | Mínima |
| 75 | 235 | 314 | 392 |
| 76 | 30 | 40 | 50 |
| 98 | 485 | 646 | 808 |

Leram-se no total 50 amostras diferentes (N=50), 17 para construção da curva de calibração Zn75 (Figura 27), 15 para a Zn76 (Figura 28) e 18 para a Zn98 (Figura 29), das quais 20 foram amostras de linha e as restantes 30 amostras experimentais. Isto correspondeu a 150 replicados por espectrometria de XRF e 100 replicados por FAAS.

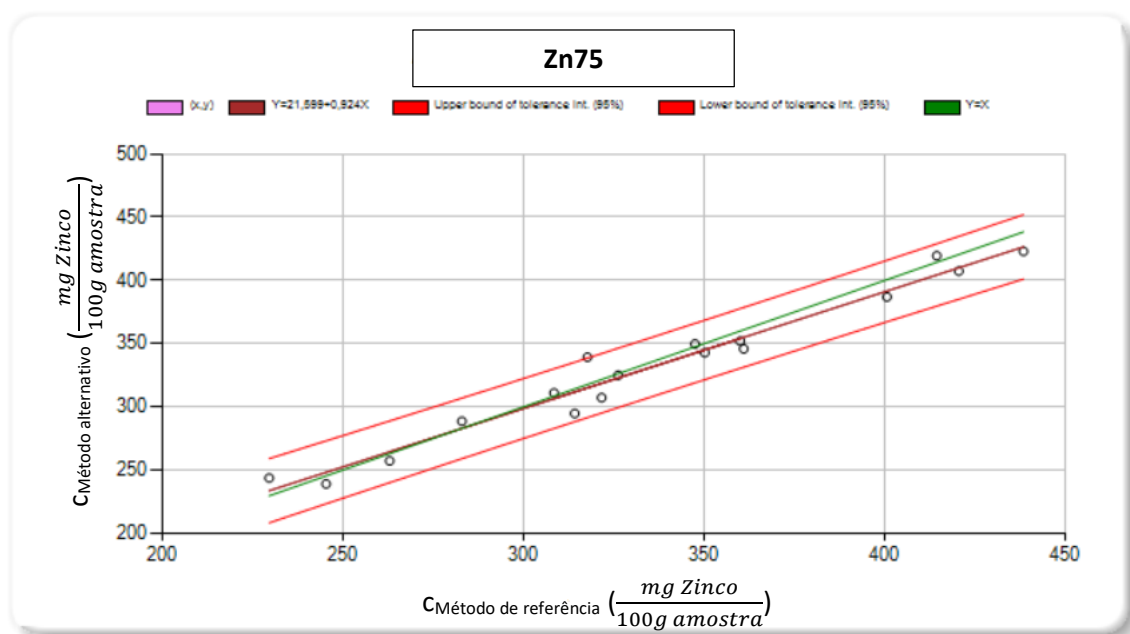


Figura 27 – Curva de calibração de zinco para a PM 75 gerada pelo *software* QStat. Estão representados os valores médios de concentração de zinco obtidos pelo método alternativo em função dos valores médios de concentração obtidos pelo método de referência, para cada uma das 17 amostras. São visíveis também os limites de confiança de 95% (a vermelho) e a regressão linear dos pontos obtidos (a castanho).

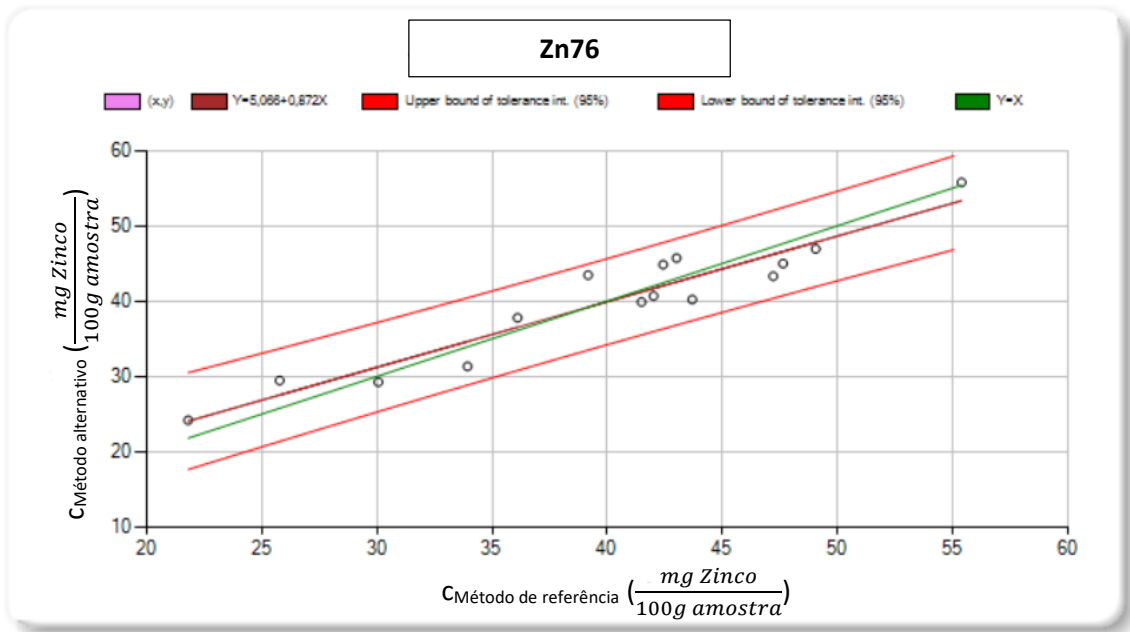


Figura 28 – Curva de calibração de zinco para a PM 76 gerada pelo *software* QStat. Estão representados os valores médios de concentração de zinco obtidos pelo método alternativo em função dos valores médios de concentração obtidos pelo método de referência, para cada uma das 15 amostras. São visíveis também os limites de confiança de 95% (a vermelho) e a regressão linear dos pontos obtidos (a castanho).

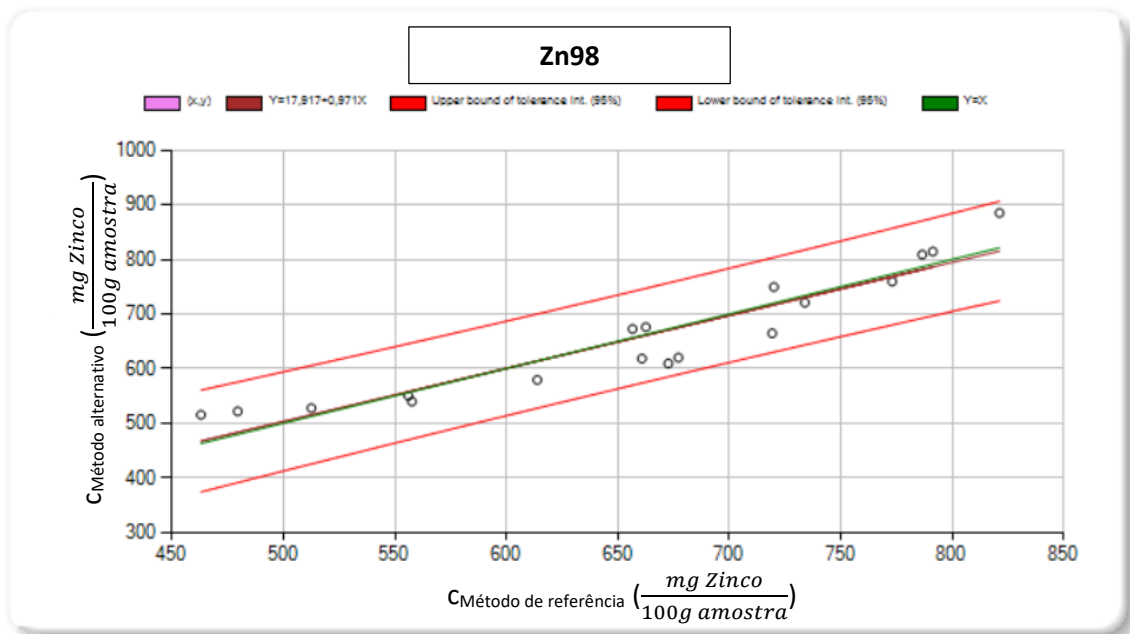


Figura 29 – Curva de calibração de zinco para a PM 98 gerada pelo *software* QStat. Estão representados os valores médios de concentração de zinco obtidos pelo método alternativo em função dos valores médios de concentração obtidos pelo método de referência, para cada uma das 18 amostras. São visíveis também os limites de confiança de 95% (a vermelho) e a regressão linear dos pontos obtidos (a castanho).

Conformidade com os critérios de Qualidade da Nestlé

Seguiu-se a verificação da conformidade dos modelos criados (Tabela 18) com os 7 critérios da Nestlé.

Tabela 18 – Características dos modelos de calibração de zinco obtidos e respectivas regressões lineares.

| Curva de calibração | Gama de concentrações ($\frac{mg\ Zinco}{100g\ amostra}$) | | Regressão linear | N | R ² |
|---------------------|--|--------|--|----|----------------|
| | Mín. | Máx. | | | |
| Zn75 | 229,43 | 438,36 | CMétodo alternativo ($\frac{mg\ Zinco}{100g\ amostra}$) = 0,924 x CMétodo de referência ($\frac{mg\ Zinco}{100g\ amostra}$) + 21,599 | 17 | 0,967 |
| Zn76 | 21,79 | 55,40 | CMétodo alternativo ($\frac{mg\ Zinco}{100g\ amostra}$) = 0,872 x CMétodo de referência ($\frac{mg\ Zinco}{100g\ amostra}$) + 5,066 | 15 | 0,911 |
| Zn98 | 462,92 | 821,27 | CMétodo alternativo ($\frac{mg\ Zinco}{100g\ amostra}$) = 0,971 x CMétodo de referência ($\frac{mg\ Zinco}{100g\ amostra}$) + 17,917 | 18 | 0,884 |

Em relação à avaliação visual do gráfico e regressão linear (critérios 1 e 2), verificou-se que os três modelos de calibração têm gamas de concentrações de zinco mais amplas e que incluem as gamas de concentrações de zinco nas receitas das PMs 75, 76 e 98 (Tabela 17), distribuindo-se os pontos de maneira satisfatória ao longo do eixo das abcissas. Os coeficientes de determinação (R²) obtidos foram de 0,967 para o modelo Zn75, 0,911 para o modelo Zn76 e 0,884 para o modelo Zn98, estando estes três valores acima do requerido pelo critério 3 (R² ≥ 0,850). Os valores de SEC e SEP obtidos foram, respetivamente, 10,711 mg/100g e 11,725 mg/100g para a Zn75, 2,563 mg/100g e 2,639 mg/100g para a Zn76, 39,434 mg/100g e 37,330 mg/100g para a Zn98 sendo por isso $SEP_{Zn75}/SEC_{Zn75} = 1,09 \leq 1,5$, $SEP_{Zn76}/SEC_{Zn76} = 1,03 \leq 1,5$ e $SEP_{Zn98}/SEC_{Zn98} = 0,95 \leq 1,5$, cumprindo-se nas três curvas os critérios 4 e 5. Fez-se uma análise por *QStat*, com um intervalo de confiança superior e inferior de 95%, e obteve-se os valores mínimo, central e máximo à volta do declive e da interseção com o eixo das ordenadas para os modelos de calibração Zn75, Zn76 e Zn98 (Tabela 19).

Tabela 19 – Intervalos de confiança à volta do declive e das intersecções dos modelos com o eixo das ordenadas.

| | Mín. | Central | Máx. | Decisão |
|---|----------|---------|---------|----------|
| Modelo de calibração Zn75 | | | | |
| Declive | 0,830 | 0,924 | 1,018 | Inclui 1 |
| Intersecção com eixo das ordenadas | -10,369 | 21,599 | 53,567 | Inclui 0 |
| Modelo de calibração Zn76 | | | | |
| Declive | 0,708 | 0,872 | 1,035 | Inclui 1 |
| Intersecção com eixo das ordenadas | -1,605 | 5,066 | 11,736 | Inclui 0 |
| Modelo de calibração Zn98 | | | | |
| Declive | 0,785 | 0,971 | 1,157 | Inclui 1 |
| Intersecção com eixo das ordenadas | -106,264 | 17,917 | 142,097 | Inclui 0 |

Assim, os intervalos de confiança à volta dos declives incluem 1 e à volta das intersecções com os eixos das ordenadas incluem 0, tendo sido então garantida a conformidade dos modelos de calibração Zn75, Zn76 e Zn98 com os 7 critérios base da Nestlé.

5.4 Análise à performance dos modelos de calibração

A conformidade com os critérios descritos anteriormente não garante, por si só, que um modelo de calibração tenha uma boa performance para a leitura da concentração de cálcio, ferro e zinco em PMs. Um ponto muito importante da qualidade de um modelo de calibração de um método alternativo é que este não apresente desvios significativos na leitura de concentrações em relação às obtidas pelo método de referência. Para inferir sobre a performance dos modelos criados, leram-se grupos de amostras de cada uma das PMs (Tabelas 20 a 22), para verificar qual o desvio entre medições pelos métodos alternativo e de referência.

Tabela 20 – Concentrações de cálcio, ferro e zinco em amostras de PM75 da linha de produção pelos métodos de referência e alternativo, assim como a respectiva diferença em valor absoluto entre os dois valores obtidos.

| Amostra | [Ca] ($\% \frac{m_{\text{cálcio}}}{m_{\text{amostra}}}$) | | | [Fe] ($\% \frac{m_{\text{ferro}}}{m_{\text{amostra}}}$) | | | [Zn] ($\frac{\text{mg Zinco}}{100\text{g amostra}}$) | | |
|----------|--|------|--------------------|---|------|--------------------|--|--------|--------------------|
| | FAAS | XRF | Diferença absoluta | FAAS | XRF | Diferença absoluta | FAAS | XRF | Diferença absoluta |
| 75-02892 | 12,7 | 11,7 | 1,0 | 1,11 | 1,00 | 0,11 | 307,15 | 344,85 | 37,70 |
| 75-17970 | 11,2 | 12,1 | 0,9 | 1,05 | 0,98 | 0,07 | 325,66 | 347,35 | 21,69 |
| 75-18878 | 10,8 | 11,7 | 0,9 | 1,05 | 1,00 | 0,05 | 331,90 | 323,38 | 8,52 |
| 75-44808 | 11,4 | 11,8 | 0,4 | 1,05 | 1,01 | 0,10 | 295,82 | 309,91 | 14,09 |
| 75-56316 | 12,2 | 12,0 | 0,2 | 1,08 | 0,98 | 0,10 | 321,27 | 325,46 | 4,19 |
| 75-56552 | 11,1 | 12,1 | 1,0 | 1,05 | 1,00 | 0,05 | 319,40 | 380,76 | 61,36 |
| 75-81500 | 11,1 | 12,0 | 0,9 | 1,04 | 0,99 | 0,05 | 331,79 | 338,37 | 6,57 |
| 75-81524 | 12,0 | 11,4 | 0,6 | 1,11 | 1,02 | 0,09 | 304,12 | 292,54 | 11,58 |

Tabela 21– Concentrações de cálcio, ferro e zinco em amostras de PM76 da linha de produção pelos métodos de referência e alternativo, assim como a respectiva diferença em valor absoluto entre os dois valores obtidos.

| Amostra | [Ca] ($\% \frac{m_{\text{cálcio}}}{m_{\text{amostra}}}$) | | | [Fe] ($\% \frac{m_{\text{ferro}}}{m_{\text{amostra}}}$) | | | [Zn] ($\frac{\text{mg Zinco}}{100\text{g amostra}}$) | | |
|----------|--|------|--------------------|---|------|--------------------|--|-------|--------------------|
| | FAAS | XRF | Diferença absoluta | FAAS | XRF | Diferença absoluta | FAAS | XRF | Diferença absoluta |
| 76-03084 | 26,5 | 27,0 | 0,5 | 1,43 | 1,40 | 0,03 | 41,33 | 41,33 | 0,00 |
| 76-15654 | 29,1 | 27,2 | 1,9 | 1,46 | 1,45 | 0,01 | 39,47 | 38,81 | 0,66 |
| 76-45996 | 28,3 | 26,9 | 1,4 | 1,43 | 1,49 | 0,06 | 41,17 | 40,26 | 0,92 |
| 76-63902 | 26,4 | 27,1 | 0,7 | 1,46 | 1,45 | 0,01 | 39,91 | 40,19 | 0,28 |
| 76-70752 | 26,0 | 27,3 | 1,3 | 1,43 | 1,43 | 0,00 | 42,19 | 38,48 | 3,71 |

Tabela 22 – Concentrações de cálcio, ferro e zinco em amostras de PM76 da linha de produção pelos métodos de referência e alternativo, assim como a respetiva diferença em valor absoluto entre os dois valores obtidos.

| Amostra | [Ca] ($\% \frac{m_{\text{cálcio}}}{m_{\text{amostra}}}$) | | | [Fe] ($\% \frac{m_{\text{ferro}}}{m_{\text{amostra}}}$) | | | [Zn] ($\frac{\text{mg Zinco}}{100\text{g amostra}}$) | | |
|----------|--|------|--------------------|---|------|--------------------|--|--------|--------------------|
| | FAAS | XRF | Diferença absoluta | FAAS | XRF | Diferença absoluta | FAAS | XRF | Diferença absoluta |
| 98-01195 | 19,1 | 21,6 | 2,5 | 2,05 | 2,59 | 0,54 | 708,10 | 610,12 | 97,99 |
| 98-07093 | 20,6 | 22,0 | 1,4 | 2,04 | 2,60 | 0,56 | 664,70 | 625,81 | 38,90 |
| 98-83571 | 20,0 | 21,5 | 1,5 | 2,09 | 2,52 | 0,43 | 704,45 | 642,82 | 61,64 |
| 98-95469 | 20,2 | 22,1 | 1,9 | 2,10 | 2,63 | 0,53 | 679,45 | 645,76 | 33,69 |
| 98-95476 | 20,0 | 21,5 | 1,4 | 2,06 | 2,51 | 0,45 | 678,49 | 590,41 | 88,09 |

Para a análise da performance das curvas de calibração, considera-se que esta é tanto melhor quanto menor for o desvio dos resultados entre os métodos de referência e alternativo. No entanto, para concentrações superiores é normal e mais tolerável um desvio superior, em valor absoluto, entre métodos. Então, para existir uma base de comparação lógica entre a performance de curvas para concentrações diferentes, fez-se o cálculo do desvio relativo (em relação aos valores obtidos por FAAS) nas leituras para cada PM usando a equação:

$$\text{desvio relativo}(\text{analito})_{PM}(\%) = \frac{\text{diferenças absolutas}(\text{analito})}{[\text{analito}]_{FAAS}} \times 100\%$$

Tabela 23 – Performance das leituras das amostras de linha de PM 75, 76 e 98.

| Performance nas leituras em PM 75 | | Performance nas leituras em PM 76 | | Performance nas leituras em PM 98 | |
|-----------------------------------|-----------------|-----------------------------------|-----------------|-----------------------------------|-----------------|
| Elemento | Desvio relativo | Elemento | Desvio relativo | Elemento | Desvio relativo |
| Ca | 6,3% | Ca | 4,3% | Ca | 8,8% |
| Fe | 6,9% | Fe | 1,6% | Fe | 24,1% |
| Zn | 6,5% | Zn | 2,7% | Zn | 9,3% |

Analisando os desvios relativos obtidos (Tabela 23), constatou-se que a maioria das leituras tem valores de desvio relativo inferiores a 7%, havendo por isso bastante semelhança entre os resultados obtidos por espectrometria de XRF e FAAS. As leituras com pior performance

são as de cálcio, ferro e zinco da PM 98. Daqui, destaca-se pela negativa a performance do modelo Fe7698 para ler concentrações de ferro em amostras de PM 98, existindo um desvio relativo de 24,1% do método alternativo em relação ao de referência. Este pode estar relacionado com o facto de se terem juntado amostras de PM 76 e 98 na construção deste modelo de calibração. Embora a matriz destas pré-misturas tenha parecenças consideráveis, não é igual. Isto poderá ter tido um efeito negativo na construção de uma curva de calibração para a quantificação de ferro conjunta. Uma possível solução poderia ser separar o modelo Fe7698 em dois, um para cada PM, atenuando assim o efeito negativo das diferenças de matriz. Outro motivo para a existência de desvios tem a ver com o facto de terem existido efeitos negativos na precisão (que foram analisadas no próximo subcapítulo) do método alternativo, sendo este efeito particularmente importante nos modelos para quantificação de zinco, por se destinarem a ler concentrações muito mais baixas.

5.5 Análise à precisão do método alternativo – repetibilidade de todas as leituras de amostras usadas na construção modelos calibração

A análise à precisão do método alternativo foi, à semelhança do restante tratamento estatístico já apresentado, feita utilizando o *software* Qstat. Este programa utiliza a Estatística Robusta nos cálculos, permitindo uma comparação aos resultados que se obteriam pela Estatística Clássica. A maior diferença entre as duas estatísticas mencionadas, é o peso que os *outliers* têm. *Outliers* são valores amostrais que causam surpresa em relação à maioria dos restantes valores obtidos. Através da Estatística Clássica usam-se médias de valores amostrais para calcular parâmetros estatísticos e, por isso, um único valor fora do esperado pode alterar completamente os resultados obtidos. A Estatística Robusta usa antes a mediana dos valores amostrais, sendo esta resistente a desvios grosseiros.[42][44] Assim, “*outliers*” com um desvio padrão muito elevado entre replicados de uma mesma amostra que existiram nas leituras para a construção dos modelos de calibração não tiveram um impacto forte nos parâmetros de precisão que foram calculados por QStat.[34][43][44] Um exemplo explicativo de cálculo dos parâmetros de repetibilidade tanto pela estatística clássica como robusta foi adicionado em anexo (Anexo B1), sendo visíveis as diferenças nos resultados das duas.

Tabela 24 – Parâmetros de repetibilidade para o método de espectrometria de XRF (amostras lidas em triplicado para cada modelo de calibração)

| Modelo | Número de replicados | Gama de concentração ^a | | Repetibilidade ^b | | | |
|--------|----------------------|-----------------------------------|--------|-----------------------------|-------|--------|-------|
| | | Mín. | Máx. | SD(r) | CV(r) | r | r% |
| Ca75 | 66 | 6,3 | 18,3 | 0,18 | 1,6% | 0,51 | 4,4% |
| Ca7698 | 78 | 16,0 | 35,0 | 0,18 | 0,7% | 0,51 | 1,9% |
| Fe75 | 54 | 0,6 | 1,67 | 0,0069 | 0,69% | 0,0192 | 1,93% |
| Fe7698 | 75 | 0,74 | 3,28 | 0,035 | 2,3% | 0,096 | 6,4% |
| Zn75 | 51 | 229,43 | 438,36 | 17,03 | 5,0% | 47,19 | 13,9% |
| Zn76 | 45 | 21,79 | 55,40 | 2,34 | 5,8% | 6,49 | 16,0% |
| Zn98 | 54 | 462,92 | 821,27 | 17,71 | 2,8% | 49,10 | 7,6% |

a - Os valores de concentrações mínimas e máximas estão em $(\% \frac{m_{analito}}{m_{amostra}})$ para os modelos Ca75, Ca7698, Fe75 e Fe7698 e em $(\frac{mg \text{ Zinco}}{100g \text{ amostra}})$ para os modelos Zn75, Zn76 e Zn98

b – SD(r) é o desvio padrão da repetibilidade, CV(r) é o coeficiente de variação, r é o limite de repetibilidade a 95% para os replicados e r% é o limite de repetibilidade relativo a 95% para os replicados

Constatou-se, por análise dos parâmetros de repetibilidade (Tabela 24), que quando se trabalha com concentrações mais pequenas, o sistema de espectrometria de XRF tende a apresentar variações maiores entre replicados e assim uma menor repetibilidade, porque se está a trabalhar mais próximo do limite de quantificação (LOQ) de método. Com efeito, verificou-se que os valores do coeficiente de variação (CV) e limite de repetibilidade a 95% (r%) são máximos para o modelo Zn76, que opera na gama de concentrações mais pequena. Os restantes modelos para a quantificação de zinco Zn75 e Zn98 também apresentaram maiores CV e r% em relação aos modelos para a quantificação de cálcio e ferro, que operam em gamas de concentração consideravelmente maiores. A justificação para uma diminuição da precisão não está limitada, porém, às gamas de concentração em que se opera. O método utilizado para a preparação das amostras não incluiu qualquer etapa de prensagem da mesma, sendo por isso a superfície de contacto da amostra com o milar irregular (Figura 30).

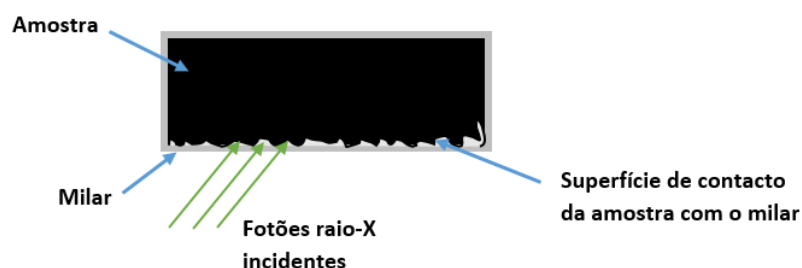


Figura 30 – Esquema da incidência de fótons raio-X na superfície de contacto entre amostra e milar.

Pela existência de irregularidade da superfície de contacto da amostra com o milar, aquando a incidência de fotões de raio-X na mesma existem dois efeitos que ocorrem: a existência de locais “cegos” e a sobrepenetração dos raios-X na amostra. Os locais “cegos” são regiões da amostra que os raios-X não vão conseguir atingir. Isto acontece porque quanto maior a irregularidade de uma superfície, maior o número de planos superficiais diferentes na mesma. Assim, existe maior probabilidade de existir um local interior da superfície que os raios-X não atingem, porque na sua trajetória estão outros planos da amostra. Este efeito resulta numa submedição nas contagens por segundo no detetor do espectrómetro de XRF e, assim, em desvios entre replicados de uma mesma amostra. A sobrepenetração dos raios-X na amostra acontece quando, pela irregularidade da amostra, os fotões conseguem penetrar mais fundo na amostra do que seria de esperar, havendo a geração de fluorescência primária e secundária numa maior porção da amostra. Isto vai iludir também as contagens por segundo no detetor do espectrómetro de XRF, aumentando-as, gerando também desvios significativos na leitura de concentração entre replicados de uma mesma amostra.

Conclusões

Objetivos Realizados

Este trabalho tinha como objetivos principais a criação, aceitação, verificação e validação de modelos de calibração num novo método por espectrometria de XRF para a determinação de teores de cálcio, ferro e zinco em PMs 75, 76 e 98, usadas para a fortificação de diversas farinhas infantis na fábrica da Nestlé de Avanca.

De facto, criaram-se com sucesso sete modelos de calibração (Ca75, Ca7698, Fe75, Fe7698, Zn75, Zn76 e Zn98) que posteriormente foram aceites por apreciação das suas características e as da regressão linear dos pontos de cada modelo, verificando-se que cumprem os sete critérios gerais da empresa para a aceitação de modelos de calibração.

Em relação à verificação realizada, leram-se amostras de linha utilizando cada modelo para testar qual a performance dos mesmos para a determinação de teores de cálcio, ferro e zinco. Verificou-se que o desvio relativo entre o teor determinado utilizando o método analítico de referência (FAAS) e o teor previsto por cada modelo é inferior a 9,5% para todos os modelos, exceto a previsão de ferro para a PM 98 em que o valor do desvio ascendeu a 24%. Assim, concluiu-se que os modelos criados geram previsões próximas aos valores de referência, excetuando a Fe7698, que se concluiu carecer de otimização.

Para a verificação dos modelos de calibração criados, fez-se também uma análise à repetibilidade entre replicados obtidos no método analítico alternativo. Constatou-se que os piores índices de repetibilidade ocorreram nos modelos para a determinação de teores de zinco (Zn75, Zn76 e Zn98), concluindo-se que o método é menos preciso quando se trabalha em gamas de concentração mais baixas.

Apreciação Final e Trabalho Futuro

Como uma continuação ao trabalho desenvolvido, poder-se-ia separar o modelo de calibração Fe7698 em dois modelos, o Fe76 e o Fe98, destinados a quantificar a concentração de ferro em PMs 76 e 98, respetivamente. Desta maneira, poder-se-ia minimizar o efeito de diferenças na composição e textura da matriz das amostras e aumentar a performance nas leituras do teor de ferro em amostras de PM 98. Para se melhorar a repetibilidade nas curvas para a quantificação de zinco, uma alteração no método da preparação dos copos amostrais a serem lidos pelo método alternativo poderia ser implementada, nomeadamente uma etapa de prensagem do conteúdo da amostra contra o milar, de modo a minimizar a irregularidade na

superfície de contacto amostra-milar e, assim, minimizar também as ocorrências de pontos “cegos” e de sobrepenetração de raios-X na amostra.

Outra continuação ao trabalho desenvolvido seria iniciar o processo de validação dos modelos criados. Para isso, faltaria utilizar amostras de concentrações diferentes representativas das gamas de concentração de cada modelo, mas que não estivessem incluídas na construção dos mesmos. Com base na diferença entre os resultados obtidos pelo método de referência e alternativo, uma avaliação de cada modelo poderia ser feita, validando-o ou rejeitando-o. Um ponto da validação que ficou também por verificar foi a incerteza das medições de cada modelo de calibração. Isto poderia ter sido feito lendo uma amostra de referência em cada modelo criado, durante pelo menos seis dias. A incerteza seria então calculada tendo como base o desvio-padrão dos resultados dos seis dias. Tendo este valor e os dos parâmetros da repetibilidade (calculados) em conta, poder-se-ia calcular qual é, de facto, a incerteza cada valor previsto por cada modelo de calibração.

Bibliografia

- [1] I. Preschool, A. Soon, and I. D. Poor, "Normal growth and development." *Medical Encyclopedia*, 2016.
- [2] A. Acosta, J. Fanzo, "Fighting Maternal and Child Malnutrition : Analysing the political and institutional determinants of delivering a national multisectoral response in six countries" *Institute of Development Studies UN Reach, World Food Pro*, pp. 1–39, 2012.
- [3] S. Psaki, Z. A. Bhutta, T. Ahmed, S. Ahmed, P. Bessong, M. Islam, S. John, M. Kosek, A. Lima, C. Nesamvuni, P. Shrestha, E. Svensen, M. Mcgrath, S. Richard, J. Seidman, L. Caulfield, M. Miller, and W. Checkley, "Household food access and child malnutrition : results from the eight-country MAL-ED study," *Population Health Metrics*, pp. 1–11, 2012.
- [4] L. S. Yilmaz and A. J. M. Walhout, "Worms , bacteria , and micronutrients : an elegant model of our diet," *Trends in Genetics*, pp. 1–8, 2014.
- [5] A. Ickowitz, B. Powell, M. A. Salim, and T. C. H. Sunderland, "Dietary quality and tree cover in Africa," *Global Environmental Change*, vol. 24, pp. 287–294, 2014.
- [6] R. K. Gupta, S. S. Gangoliya, and N. K. Singh, "Reduction of phytic acid and enhancement of bioavailable micronutrients in food grains," *Journal of Food Science and Technology*, vol. 52, no. 2, pp. 676–684, 2013.
- [7] J. K. Das, R. A. Salam, R. Kumar, and Z. A. Bhutta, "Micronutrient fortification of food and its impact on woman and child health : a systematic review," *Systematic Reviews*, 2013.
- [8] D. Lm, S. Ps, V. Ge, S. Walleser, and P. Jp, "Home fortification of foods with multiple micronutrient powders for health and nutrition in children under two years of age (Review)," *Evidence-Based Child Health* vol. 201, no. 9, pp. 112–201, 2013.
- [9] L. Allen and B. De Benoist, "Guidelines on food fortification with micronutrients." *World Health Report*, Geneva, World Health Organization, 2006.
- [10] R. E. Black, "Micronutrients in pregnancy," *British Journal of Nutrition*. 193–197, 2001.
- [11] M. Maclennan, C. Mason, E. Mason, M. Mbizvo, S. Mendis, T. Mertens, Z. Mirza, M. Neira, K. Parker, M. Pfeiffer, K. Ranson, M. Raviglione, J. Reeder, A. Ross, C. Roth, S. Russell, R. Sadana, A. Saxena, T. Saywell, T. Shakespeare, I. Sleeman, J. Sommerfeld, M. Temmerman, D. Weil, and K. Weyer, "Research for Universal Health Coverage," *The World Health Report*, 2013.
- [12] S. Pasricha, H. Drakesmith, J. Black, D. Hipgrave, and B. Biggs, "Review Article Control of iron deficiency anemia in low- and middle-income countries," *Blood* vol. 121, no. 14, pp. 1–3, 2016.
- [13] S. J. Whiting, W. M. Kohrt, M. P. Warren, M. I. Kraenzlin, and J. Bonjour, "Food fortification for bone health in adulthood : a scoping review," *European Journal of Clinical Nutrition*, 1–7no. October 2015, pp. 1–7, 2016.
- [14] P. Mandatory and P. June, "Nestlé Policy on Micronutrient Fortification of Foods & Beverages," no. June, 2015. Acedido em <http://intranet.nestle.com/nestledocs>.
- [15] M. Bana and R. K. Gupta, "Formulation , nutritional and phytochemical analysis of ready to mix infant Food using Gorgon Nut , Samak Rice and Banana powder," *Journal of*

- Pharmacognosy and Phytochemistry* 2015; 4(4): 76-81, 2015.
- [16] R. P. Heaney, "The Importance of Calcium Intake For Lifelong Skeletal Health," *Calcified Tissue International* pp. 70–73, 2002.
- [17] "Iron Deficiency Anaemia." *World Health Organization*, 2001.
- [18] L. E. Caulfield and R. E. Black, "Zinc deficiency" *Comparative Quantification of Health Risks*, 2003.
- [19] P. M. March, "Nestlé Quality Policy," no. March, 2014. Acedido em http://www.nestle.com/asset-library/documents/library/documents/corporate_social_responsibility/nestle-csv-full-report-2014-en.pdf.
- [20] "Quality and Safety | Nestlé Global." [Online]. Acedido em: <http://www.nestle.com/aboutus/quality-and-safety>.
- [21] "Princípios Corporativos Empresariais da Nestlé" 2010. Acedido em: https://empresa.nestle.pt/recursos humanos/documents/principios_corporativos_jun_2010.pdf.
- [22] R. Levinson, "Atomic absorption spectrometry." *Royal Society of Chemistry*, 2014
- [23] F. M. . Dunnivant and J. W. Ginsbach, "Flame Atomic Absorption and Emission Spectrometry," *Flame Atomic Absorbance Emission Spectroscopy Inductively Coupled Spectrometry - Mass Spectrometry*, 2009.
- [24] G. P. G. Freschi, C. S. Dakuzaku, J. A. Gomes Neto, and M. De Moraes, "Espectrometria de absorção atômica multielementar simultânea com atomização eletrotérmica em forno de grafite - uma revisão da técnica e aplicações," *Eclética Química*, no. 25, pp. 213–226, 2000.
- [25] S. Patrícia and S. Marcelino, "Monitorização de Águas Superficiais" Departamento de Química, Universidade da Beira Interior, 2008.
- [26] H. and W. Ltd., "Hollow cathode lamps," *Journal of Scientific Instruments*, vol. 33, no. 3, pp. 127–127, 2002.
- [27] M. Baroni Jr, R. M. Barbosa, and S. R. dos Santos, "Análise Físico-Química de Amostras Ambientais: Determinação de metais por Espectrometria de Absorção Atômica em amostras de água e solo. Métodos de coleta, amostragem e preparo.", 2010.
- [28] "Mecânica dos Fluidos - Experimento Medidor de Vazão: Venturi | Engenharia Blog." [Online]. Acedido em: <http://www.engenhariablog.com/2016/03/mecanica-dos-fluidos-experimento.html>.
- [29] D. Harvey, "0.4: Atomic Absorption Spectroscopy 10.4: Atomic Absorption Spectroscopy," *ChemWiki*, 2008.
- [30] K.-S. Lee, K. P. Thompson, and J. P. Rolland, "Broadband astigmatism-corrected Czerny–Turner spectrometer," *Optics Express*, vol. 18, no. 22, p. 23378, Oct. 2010.
- [31] HAMAMATSU, "Photomultiplier Tubes Construction and Operating Characteristics Connections to External Circuits." *Hamamatsu*, 2006.
- [32] A. Cotta, "Fotometria de Chama e Absorção Atômica" 2014.
- [33] P. Brouwer, "THEORY OF XRF Getting acquainted with the principles." ISBN: 90-

9016758-7 3rd edition.

- [34] L. Perring and J. Blanc, "Validation of quick measurement of mineral nutrients in milk powders : comparison of energy dispersive X-ray fluorescence with inductively coupled plasma-optical emission spectroscopy and potentiometry reference methods," *Sensing & Instrumentation for Food Quality* 2:254–261, 2008.
- [35] X. Zhou, Y. Zhao, R. Cheng, Y. Wang, Y. Lei, X. Wang, and Y. Sun, "K and L-shell X-ray production cross sections for 50–250keV proton impact on elements with Z=26–30" *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Sector B*, vol. 299, pp. 61–67, Mar. 2013.
- [36] R. E. Van Criecken and A. A. Markowicz, "Handbook of X-Ray Spectrometry, Second Edition," 2002.
- [37] B. Yokhin, "Wide Angle Geometry EDXRF Spectrometers With Secondary Target and Direct Excitation Modes" vol. 42, no. C, 2000.
- [38] C. Leroy and P.-G. Rancoita, "*Silicon Solid State Devices and Radiation Detection*" 2012.
- [39] R. Redus, "Amptek Application Note XRF-1: XRF Spectra and Spectra Analysis Software." *Application Note XRF-1 Rev B1 Amptek*, 2008
- [40] M. Kavčič, M. Budnar, A. Mühleisen, F. Gasser, M. Žitnik, K. Bučar, and R. Bohinc, "Design and performance of a versatile curved-crystal spectrometer for high-resolution spectroscopy in the tender x-ray range Design and performance of a versatile curved-crystal spectrometer for high-resolution spectroscopy in the tender x-ray range," *Review of Scientific Instruments* vol. 033113, no. 2012, 2014.
- [41] "PANalytical - Liquid sample cups." [Online]. Acedido: <http://www.panalytical.com/Liquid-sample-cups.htm>.
- [42] B. D. Ripley, "Robust Statistics," *Statistics Berkeley*, vol. 60, no. 1986, pp. 1–11, 2004.
- [43] P. Loic, D. Andrey, M. Basic-dvorzak, and D. Hammer, "Rapid quantification of iron , copper and zinc in food premixes using energy dispersive X-ray fluorescence," vol. 18, pp. 655–663, 2005.
- [44] C. Hugo, "Análise de Produtos de Nutrição Infantil por Fluorescência de RX" *Journal of Food Composition and Analysis* 18, 2011

Anexos

A.1 Curvas de calibração de Cálcio (com todos os replicados)

Para a construção da curva de calibração Ca75 (Figura 31), no total usaram-se as 22 amostras e 66 replicados (Tabela 25).

Tabela 25 – Pontos utilizados para a construção da curva de calibração Ca75.

| N | Amostra de calibração | Concentração calculada (%) | | | Média (%) | Valor de referência (%) |
|----|-----------------------|----------------------------|--------|--------|-----------|-------------------------|
| | | Rep. 1 | Rep. 2 | Rep. 3 | | |
| 1 | 43604575_03329 | 11,3 | 11,2 | 11,2 | 11,2 | 11,6 |
| 2 | 43604575_14888 | 11,9 | 11,7 | 11,5 | 11,7 | 11,7 |
| 3 | 43604575_69083 | 11,6 | 11,2 | 11,9 | 11,6 | 11,8 |
| 4 | 43604575_81494 | 12,1 | 12,1 | 12,2 | 12,1 | 11,9 |
| 5 | 43604575_89166 | 11,3 | 12 | 11,8 | 11,7 | 11,3 |
| 6 | 43604575_93705 | 11,4 | 11,9 | 11,6 | 11,6 | 11,2 |
| 7 | 43604575_94528 | 11,8 | 11,6 | 11,6 | 11,7 | 12 |
| 8 | Padrão10_75 | 6,2 | 6,1 | 6,3 | 6,2 | 6,3 |
| 9 | Padrão11_75 | 6,2 | 6,2 | 6 | 6,1 | 6,6 |
| 10 | Padrão12_75 | 5,9 | 6,2 | 5,7 | 5,9 | 6,4 |
| 11 | Padrão13_75 | 6,1 | 6,2 | 5,8 | 6,0 | 6,0 |
| 12 | Padrão14_75 | 6,3 | 6,2 | 6,3 | 6,3 | 6,0 |
| 13 | Padrão15_75 | 6,3 | 6,2 | 6,5 | 6,3 | 6,0 |
| 14 | Padrão1_75 | 17,3 | 17,2 | 17,2 | 17,2 | 18,3 |
| 15 | Padrão2_75 | 16,4 | 16,2 | 16,6 | 16,4 | 16,9 |
| 16 | Padrão3_75 | 15,4 | 15,5 | 15,4 | 15,4 | 15,8 |
| 17 | Padrão4_75 | 14,5 | 14,3 | 14,6 | 14,5 | 13,9 |
| 18 | Padrão5_75 | 13,2 | 13,1 | 13 | 13,1 | 13,1 |
| 19 | Padrão6_75 | 10,8 | 9,7 | 10,5 | 10,3 | 10 |
| 20 | Padrão7_75 | 9,8 | 9,9 | 9,7 | 9,8 | 9,3 |
| 21 | Padrão8_75 | 8,3 | 8,9 | 8,2 | 8,5 | 8,1 |
| 22 | Padrão9_75 | 7,1 | 7,3 | 7,1 | 7,2 | 7,2 |

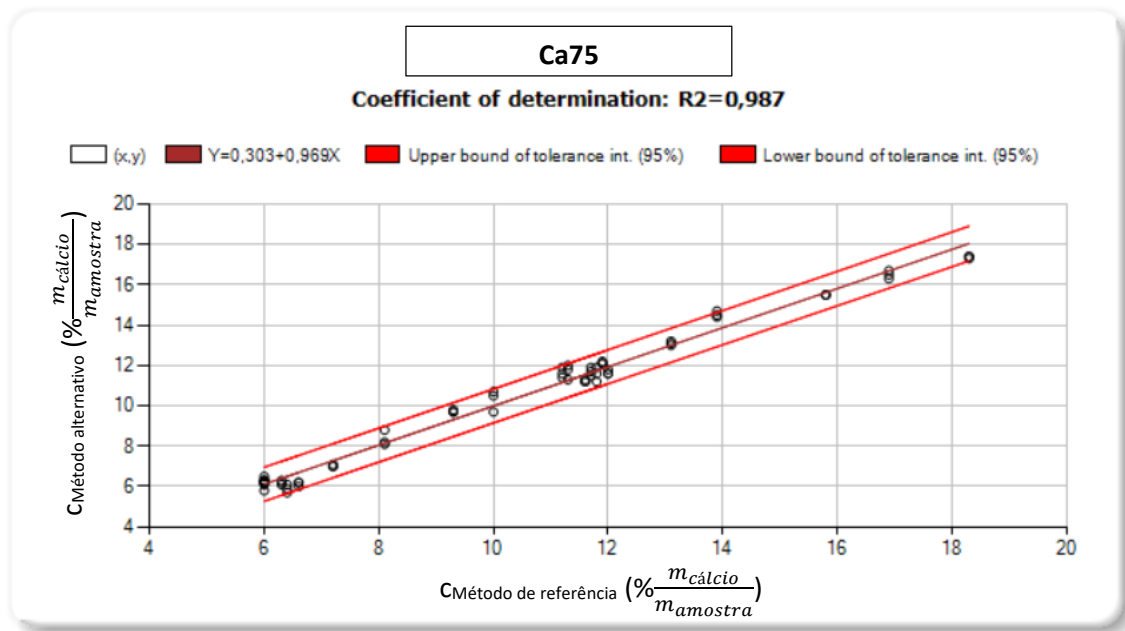


Figura 31 – Curva de calibração de cálcio para a PM 75 gerada pelo *software QStat*. Estão representados os valores de concentração de cálcio obtidos pelo método alternativo em função dos valores de concentração obtidos pelo método de referência, para cada uma das 22 amostras (66 replicados). São visíveis também os limites de confiança de 95% (a vermelho) e a regressão linear dos pontos amostrais obtidos (a castanho).

Para a construção da curva de calibração Ca7698 (Figura 32), no total usaram-se as 26 amostras e 78 replicados (Tabela 26).

Tabela 26 – Pontos utilizados para a construção da curva de calibração Ca7698.

| N | Amostra de calibração | Concentração calculada (%) | | | Média (%) | Valor de referência (%) |
|----|-----------------------|----------------------------|--------|--------|-----------|-------------------------|
| | | Rep. 1 | Rep. 2 | Rep. 3 | | |
| 1 | 43554598_05899 | 21,3 | 21,2 | 21,1 | 21,2 | 20 |
| 2 | 43554598_15416 | 21,7 | 21,6 | 21,6 | 21,6 | 19,9 |
| 3 | 43554598_45809 | 21,4 | 21,4 | 21,5 | 21,4 | 21,9 |
| 4 | 43554598_48522 | 21,6 | 21,5 | 21,4 | 21,5 | 21,3 |
| 5 | 43604576_48545 | 26,8 | 26,7 | 26,7 | 26,7 | 25,3 |
| 6 | 43604576_50175 | 26,9 | 26,8 | 26,7 | 26,8 | 28 |
| 7 | 43604576_61720 | 26,9 | 26,8 | 26,6 | 26,8 | 27 |
| 8 | 43604576_62048 | 26,7 | 26,8 | 27,2 | 26,9 | 25 |
| 9 | 43604576_69589 | 26,7 | 26,5 | 26,6 | 26,6 | 24,8 |
| 10 | 43604576_78449 | 26,3 | 26,6 | 27 | 26,6 | 26,1 |
| 11 | 43604576_91110 | 26,9 | 26,3 | 26,8 | 26,7 | 24,9 |
| 12 | 43604576_91985 | 26,9 | 26,6 | 26,9 | 26,8 | 26,3 |
| 13 | Padrao10_7698 | 22,7 | 22,5 | 22,4 | 22,5 | 22,5 |
| 14 | Padrao12_7698 | 29,7 | 29,7 | 29,7 | 29,7 | 29,2 |
| 15 | Padrao13_7698 | 29,3 | 29 | 28,9 | 29,1 | 28,3 |
| 16 | Padrao14_7698 | 27,2 | 27,3 | 27,2 | 27,2 | 27,5 |
| 17 | Padrao1_7698 | 22,8 | 23,3 | 24,1 | 23,4 | 24,8 |
| 18 | Padrao2_7698 | 23,9 | 23,8 | 23,6 | 23,8 | 25 |
| 19 | Padrao3_7698 | 18 | 18,9 | 18,9 | 18,6 | 19,2 |

| | | | | | | |
|----|--------------|------|------|------|------|------|
| 20 | Padrao4_7698 | 16,6 | 16,4 | 17 | 16,7 | 16 |
| 21 | Padrao5_7698 | 18,4 | 18,1 | 18,1 | 18,2 | 19,2 |
| 22 | Padrao6_7698 | 30,6 | 30,4 | 30,3 | 30,4 | 32,1 |
| 23 | Padrao7_7698 | 29,7 | 29,8 | 29,7 | 29,7 | 30,5 |
| 24 | Padrao8_7698 | 22,4 | 22,3 | 22,6 | 22,4 | 22,8 |
| 25 | Padrao9_7698 | 22,8 | 22,5 | 22,5 | 22,6 | 23,6 |
| 26 | PadraoCaup | 33 | 33,2 | 33,1 | 33,1 | 35 |

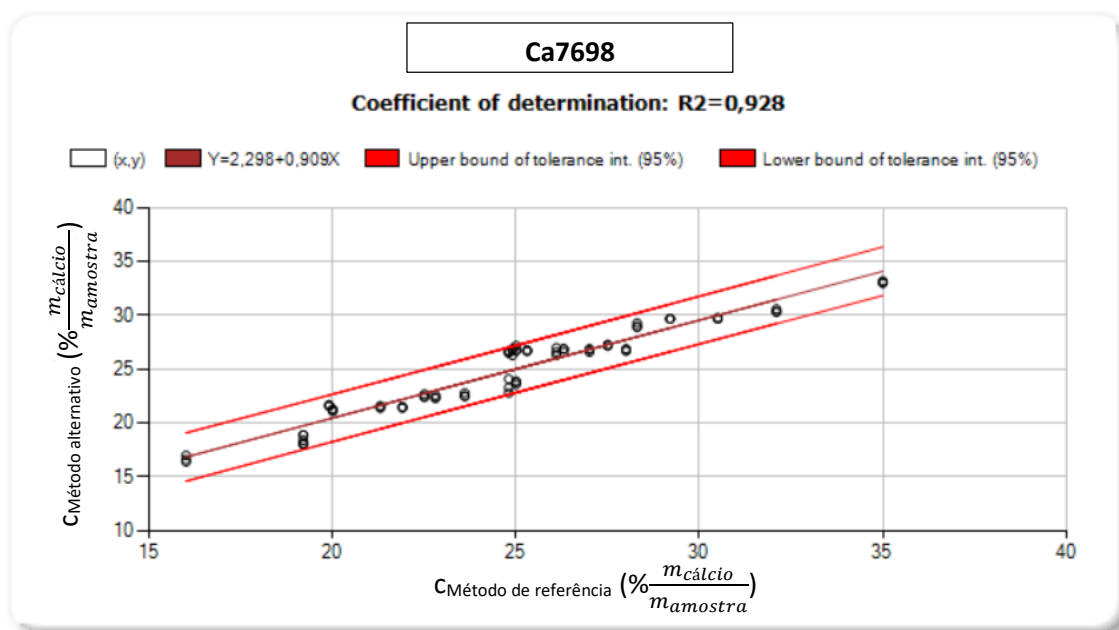


Figura 32 – Curva de calibração de cálcio para as PMs 76 e 98 gerada pelo *software QStat*. Estão representados os valores de concentração de cálcio obtidos pelo método alternativo em função dos valores de concentração obtidos pelo método de referência, para cada uma das 26 amostras (78 replicados). São visíveis também os limites de confiança de 95% (a vermelho) e a regressão linear dos pontos amostrais obtidos (a castanho).

Tabela 27 – Gama de concentrações, regressão linear, número de pontos (n) e coeficiente de determinação (R²) de cada uma das curvas de calibração de cálcio criadas.

| Curva de calibração | Gama de concentrações (% $\frac{m_{cálcio}}{m_{amostra}}$) | | Regressão linear | n | R ² |
|---------------------|--|------|--|----|----------------|
| | Mín. | Máx. | | | |
| Ca75 | 6,3 | 18,3 | $C_{\text{Método alternativo}} \left(\% \frac{m_{cálcio}}{m_{amostra}} \right) = 0,969 \times C_{\text{Método de referência}} \left(\% \frac{m_{cálcio}}{m_{amostra}} \right) + 0,303$ | 66 | 0,987 |
| Ca7698 | 16,0 | 35,0 | $C_{\text{Método alternativo}} \left(\% \frac{m_{cálcio}}{m_{amostra}} \right) = 0,909 \times C_{\text{Método de referência}} \left(\% \frac{m_{cálcio}}{m_{amostra}} \right) + 2,298$ | 78 | 0,928 |

A.2 Curvas de calibração de Ferro (com todos os replicados)

Para a construção da curva de calibração Fe75 (Figura 33), usaram-se no total 18 amostras e 53 replicados (Tabela 28).

Tabela 28 – Pontos utilizados para a construção da curva de calibração Fe75.

| N | Amostra de calibração | Concentração calculada (%) | | | Média (%) | Valor de referência (%) |
|----|-----------------------|----------------------------|-------|-------|-----------|-------------------------|
| | | Rep 1 | Rep 2 | Rep 3 | | |
| 1 | 43604575_14888 | 1,01 | 1,01 | 1,01 | 1,01 | 1,02 |
| 2 | 43604575_81494 | 0,98 | 0,98 | 0,97 | 0,98 | 0,98 |
| 3 | 43604575_94528 | 0,99 | 0,99 | 1,00 | 0,99 | 0,96 |
| 4 | Padrão10_75 | 1,72 | 1,72 | 1,72 | 1,72 | 1,62 |
| 5 | Padrão11_75 | 1,68 | 1,69 | 1,69 | 1,69 | 1,67 |
| 6 | Padrão1_75 | 0,62 | 0,63 | 0,62 | 0,62 | 0,60 |
| 7 | Padrão2_75 | 0,67 | 0,67 | 0,66 | 0,67 | 0,66 |
| 8 | Padrão3_75 | 0,71 | 0,70 | 0,71 | 0,71 | 0,71 |
| 9 | Padrão4_75 | 0,75 | 0,75 | 0,76 | 0,75 | 0,73 |
| 10 | Padrão5_75 | 0,82 | 0,82 | 0,83 | 0,82 | 0,87 |
| 11 | Padrão6_75 | 0,92 | 0,94 | 0,92 | 0,93 | 0,92 |
| 12 | Padrão7_75 | 1,02 | 1,00 | 0,99 | 1,00 | 0,93 |
| 13 | Padrão8_75 | 1,39 | 1,36 | 1,40 | 1,38 | 1,47 |
| 14 | Padrão9_75 | 1,52 | 1,54 | 1,56 | 1,54 | 1,53 |
| 15 | PadrãoFe1_75 | 0,97 | 0,95 | 0,95 | 0,96 | 1,00 |
| 16 | PadrãoFe2_75 | 1,07 | 1,07 | 1,06 | 1,07 | 1,11 |
| 17 | PadrãoFe3_75 | 1,18 | 1,19 | 1,18 | 1,18 | 1,20 |
| 18 | PadrãoFe4_75 | 1,20 | 1,23 | 1,23 | 1,22 | 1,34 |

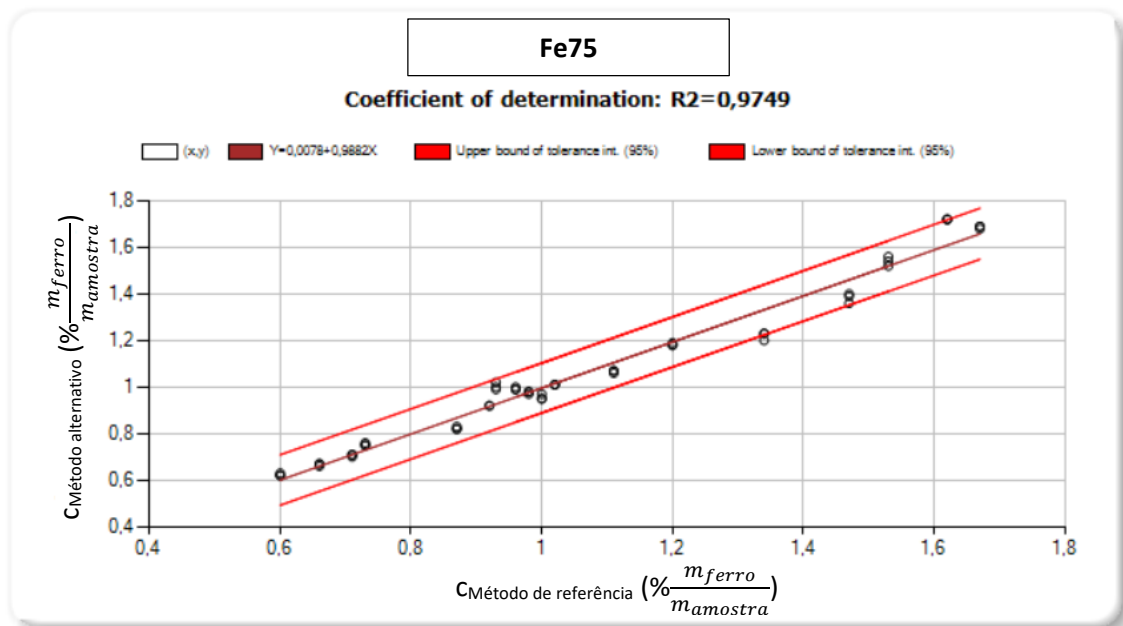


Figura 33 – Curva de calibração de ferro para a PM 75 gerada pelo *software* QStat. Estão representados os valores de concentração de ferro obtidos pelo método alternativo em função dos valores de concentração obtidos pelo método de referência, para cada uma das 18 amostras (54 replicados). São visíveis também os limites de confiança de 95% (a vermelho) e a regressão linear dos pontos amostrais obtidos (a castanho).

Para a construção da curva de calibração Fe7698 (Figura 34), usaram-se no total 25 amostras e 75 replicados (Tabela 29).

Tabela 29 – Pontos utilizados para a construção da curva de calibração Fe7698.

| N | Amostra de calibração | Concentração calculada (%) | | | Média (%) | Valor de referência (%) |
|----|-----------------------|----------------------------|--------|--------|-----------|-------------------------|
| | | Rep. 1 | Rep. 2 | Rep. 3 | | |
| 1 | 43554598_05899 | 2,44 | 2,46 | 2,46 | 2,45 | 2,42 |
| 2 | 43554598_15416 | 2,61 | 2,57 | 2,58 | 2,59 | 2,51 |
| 3 | 43554598_48522 | 2,51 | 2,53 | 2,49 | 2,51 | 2,46 |
| 4 | 43604576_48545 | 1,49 | 1,46 | 1,48 | 1,48 | 1,71 |
| 5 | 43604576_48552 | 1,52 | 1,45 | 1,47 | 1,48 | 1,7 |
| 6 | 43604576_50175 | 1,47 | 1,41 | 1,53 | 1,47 | 1,75 |
| 7 | 43604576_56586 | 1,48 | 1,46 | 1,44 | 1,46 | 1,76 |
| 8 | 43604576_61720 | 1,49 | 1,47 | 1,46 | 1,47 | 1,73 |
| 9 | 43604576_62048 | 1,49 | 1,52 | 1,4 | 1,47 | 1,76 |
| 10 | 43604576_69589 | 1,45 | 1,38 | 1,46 | 1,43 | 1,36 |
| 11 | 43604576_78449 | 1,44 | 1,44 | 1,39 | 1,42 | 1,3 |
| 12 | 43604576_91110 | 1,52 | 1,44 | 1,52 | 1,49 | 1,75 |
| 13 | 43604576_91985 | 1,44 | 1,44 | 1,41 | 1,43 | 1,34 |
| 14 | Padrao10_7698 | 2,03 | 2,04 | 2,04 | 2,04 | 1,77 |
| 15 | Padrao1_7698 | 3,1 | 3,18 | 3,21 | 3,16 | 3,28 |
| 16 | Padrao2_7698 | 3,03 | 2,83 | 3,03 | 2,96 | 2,96 |
| 17 | Padrao6_7698 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,80 | 0,74 |
| 18 | Padrao7_7698 | 1,05 | 1,03 | 1,03 | 1,04 | 1,04 |
| 19 | Padrao8_7698 | 1,07 | 1,07 | 1,04 | 1,06 | 0,81 |
| 20 | PadraoFeZn1_7698 | 2,26 | 2,22 | 2,32 | 2,27 | 2,22 |
| 21 | PadraoFeZn2_7698 | 2,34 | 2,41 | 2,37 | 2,37 | 2,35 |
| 22 | PadraoFeZn3_7698 | 2,55 | 2,45 | 2,53 | 2,51 | 2,43 |
| 23 | PadraoFeZn4_7698 | 2,19 | 2,14 | 2,17 | 2,17 | 2,07 |
| 24 | PadraoFeZn5_7698 | 2,51 | 2,57 | 2,53 | 2,54 | 2,51 |
| 25 | PadraoFeZn6_7698 | 2,58 | 2,66 | 2,59 | 2,61 | 2,61 |

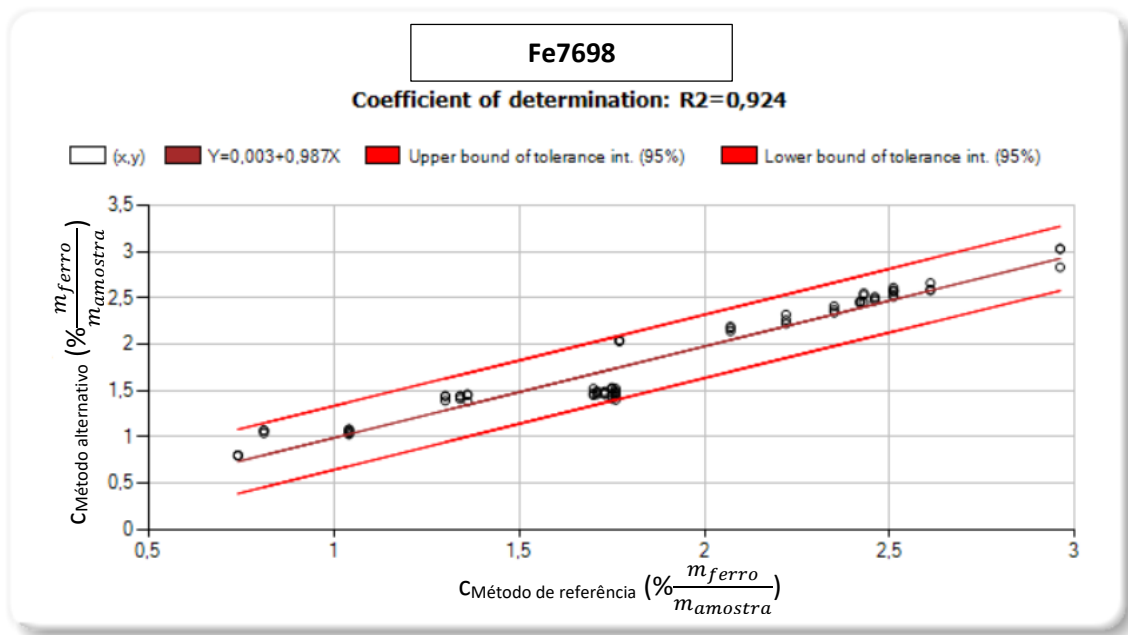


Figura 34 – Curva de calibração de ferro para as PMs 76 e 98 gerada pelo *software* QStat. Estão representados os valores de concentração de ferro obtidos pelo método alternativo em função dos valores de concentração obtidos pelo método de referência, para cada uma das 25 amostras (75 replicados). São visíveis também os limites de confiança de 95% (a vermelho) e a regressão linear dos pontos amostrais obtidos (a castanho).

Tabela 30 – Gama de concentrações, regressão linear, número de pontos (n) e coeficiente de determinação (R^2) de cada uma das curvas de calibração de ferro criadas.

| Curva de calibração | Gama de concentrações $\left(\% \frac{m_{\text{ferro}}}{m_{\text{amostra}}} \right)$ | | Regressão linear | n | R^2 |
|---------------------|--|------|--|----|--------|
| | Mín. | Máx. | | | |
| Fe75 | 0,6 | 1,67 | $C_{\text{Método alternativo}} \left(\% \frac{m_{\text{ferro}}}{m_{\text{amostra}}} \right) = 0,9882 \times C_{\text{Método de referência}} \left(\% \frac{m_{\text{ferro}}}{m_{\text{amostra}}} \right) + 0,0078$ | 54 | 0,9749 |
| Fe7698 | 0,74 | 3,28 | $C_{\text{Método alternativo}} \left(\% \frac{m_{\text{ferro}}}{m_{\text{amostra}}} \right) = 0,987 \times C_{\text{Método de referência}} \left(\% \frac{m_{\text{ferro}}}{m_{\text{amostra}}} \right) + 0,003$ | 75 | 0,924 |

A.3 Curvas de calibração de Zinco (com todos os replicados)

Para a construção da curva de calibração Zn75 (Figura 35), usaram-se no total 17 amostras e 51 replicados (Tabela 31).

Tabela 31– Pontos utilizados para a construção da curva de calibração Zn75.

| N | Amostra de calibração | Concentração calculada [mg/100g] | | | Média [mg/100g] | Valor de referência [mg/100g] |
|----|-----------------------|----------------------------------|--------|--------|-----------------|-------------------------------|
| | | Rep 1 | Rep 2 | Rep 3 | | |
| 1 | 43604575_03329 | 339,70 | 348,36 | 339,98 | 342,68 | 350,07 |
| 2 | 43604575_69083 | 339,74 | 354,00 | 355,37 | 349,70 | 347,35 |
| 3 | 43604575_81494 | 359,23 | 356,73 | 321,45 | 345,80 | 360,86 |
| 4 | 43604575_89166 | 294,57 | 319,69 | 318,51 | 310,92 | 308,31 |
| 5 | 43604575_93705 | 301,16 | 331,25 | 289,05 | 307,15 | 321,5 |
| 6 | 43604575_94528 | 359,66 | 352,21 | 343,96 | 351,94 | 359,9 |
| 7 | 43604575_98939 | 328,60 | 302,22 | 343,85 | 324,89 | 326,1 |
| 8 | Padrão10_75 | 251,53 | 247,32 | 231,97 | 243,61 | 229,43 |
| 9 | Padrão11_75 | 242,54 | 231,63 | 242,54 | 238,90 | 245,2 |
| 10 | Padrão2_75 | 392,30 | 408,97 | 467,46 | 422,91 | 438,36 |
| 11 | Padrão3_75 | 468,39 | 376,19 | 377,50 | 407,36 | 420,44 |
| 12 | Padrão4_75 | 425,85 | 411,53 | 420,93 | 419,44 | 414,32 |
| 13 | Padrão5_75 | 371,80 | 432,21 | 356,67 | 386,89 | 400,54 |
| 14 | Padrão6_75 | 338,01 | 342,07 | 337,48 | 339,19 | 317,58 |
| 15 | Padrão7_75 | 290,27 | 294,80 | 298,74 | 294,60 | 314,04 |
| 16 | Padrão8_75 | 274,89 | 309,69 | 280,96 | 288,51 | 282,79 |
| 17 | Padrão9_75 | 264,98 | 267,83 | 238,64 | 257,15 | 262,78 |

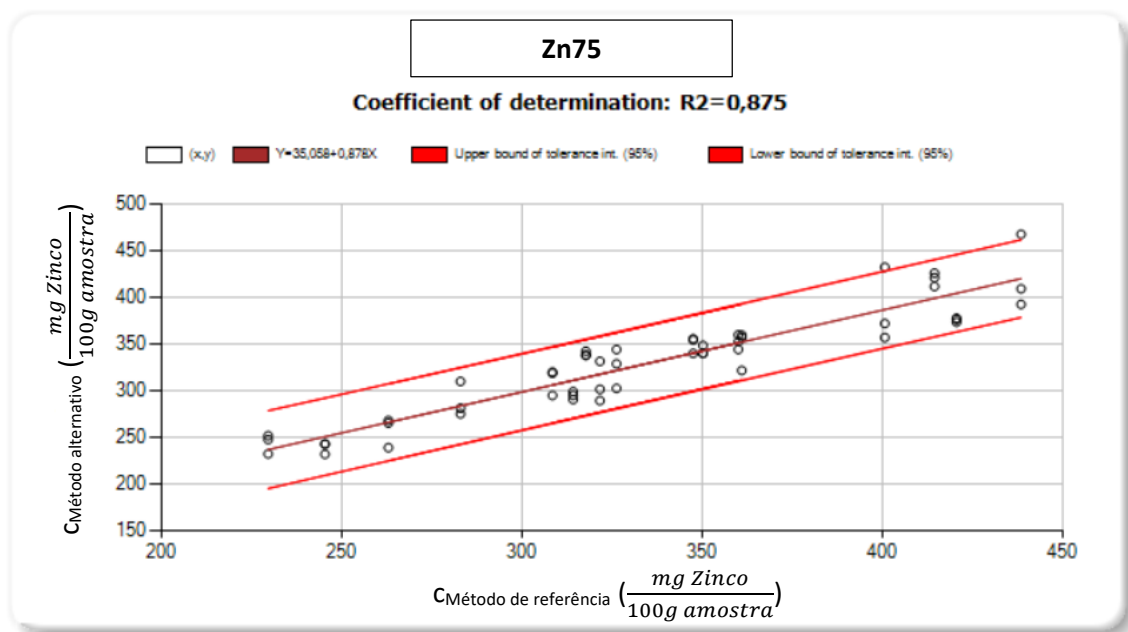


Figura 35 – Curva de calibração de zinco para a PM 75 gerada pelo *software QStat*. Estão representados os valores de concentração de zinco obtidos pelo método alternativo em função dos valores de concentração obtidos pelo método de referência, para cada uma das 17 amostras (51 replicados). São visíveis também os limites de confiança de 95% (a vermelho) e a regressão linear dos pontos obtidos (a castanho).

Para a construção da curva de calibração Zn76 (Figura 36), usaram-se no total 15 amostras e 45 replicados (Tabela 32).

Tabela 32 – Pontos utilizados para a construção da curva de calibração Zn76.

| N | Amostra de calibração | Concentração calculada [mg/100g] | | | Média [mg/100g] | Valor de referência [mg/100g] |
|----|-----------------------|----------------------------------|-------|-------|-----------------|-------------------------------|
| | | Rep 1 | Rep 2 | Rep 3 | | |
| 1 | 43604576_50175 | 47,18 | 45,31 | 44,67 | 45,72 | 43,01 |
| 2 | 43604576_56586 | 47,08 | 39,71 | 48,18 | 44,99 | 47,64 |
| 3 | 43604576_61720 | 41,56 | 44,65 | 44,18 | 43,46 | 39,17 |
| 4 | 43604576_62048 | 38,46 | 41,38 | 39,84 | 39,89 | 41,49 |
| 5 | 43604576_69589 | 47,89 | 46,44 | 40,21 | 44,85 | 42,43 |
| 6 | 43604576_91110 | 40,10 | 40,96 | 40,98 | 40,68 | 42,01 |
| 7 | 43604576_91985 | 37,83 | 39,78 | 43,03 | 40,21 | 43,69 |
| 8 | Padrao10_7698 | 57,12 | 58,38 | 51,84 | 55,78 | 55,40 |
| 9 | Padrao1_76Zn | 43,97 | 40,53 | 45,43 | 43,31 | 47,21 |
| 10 | Padrao2_76Zn | 47,24 | 48,53 | 45,05 | 46,94 | 49,06 |
| 11 | Padrao3_76Zn | 28,20 | 32,26 | 27,25 | 29,24 | 30,05 |
| 12 | Padrao6_7698 | 24,81 | 25,72 | 21,98 | 24,17 | 21,79 |
| 13 | Padrao7_7698 | 32,89 | 33,07 | 28,03 | 31,33 | 33,93 |
| 14 | Padrao8_7698 | 29,65 | 28,62 | 30,09 | 29,45 | 25,76 |
| 15 | Padrao9_7698 | 38,30 | 38,67 | 36,37 | 37,78 | 36,10 |

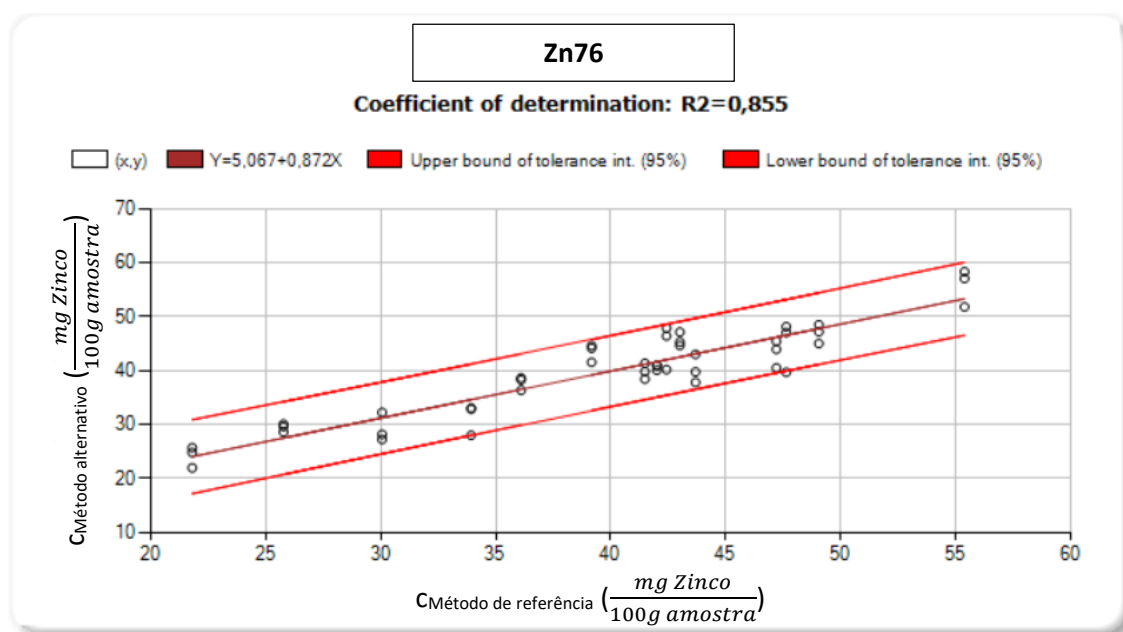


Figura 36 – Curva de calibração de zinco para a PM 76 gerada pelo *software QStat*. Estão representados os valores de concentração de zinco obtidos pelo método alternativo em função dos valores de concentração obtidos pelo método de referência, para cada uma das 15 amostras (45 replicados). São visíveis também os limites de confiança de 95% (a vermelho) e a regressão linear dos pontos obtidos (a castanho).

Para a construção da curva de calibração Zn98 (Figura 37), usaram-se no total 18 amostras e 54 replicados (Tabela 33).

Tabela 33 – Pontos utilizados para a construção da curva de calibração Zn76.

| N | Amostra de calibração | Concentração calculada [mg/100g] | | | Média [mg/100g] | Valor de referência [mg/100g] |
|----|-----------------------|----------------------------------|--------|--------|-----------------|-------------------------------|
| | | Rep 1 | Rep 2 | Rep 3 | | |
| 1 | 43554598_02357 | 594,32 | 621,61 | 612,22 | 609,38 | 672,66 |
| 2 | 43554598_15416 | 653,76 | 679,41 | 661,19 | 664,79 | 719,26 |
| 3 | 43554598_17755 | 734,29 | 775,11 | 739,07 | 749,49 | 720,05 |
| 4 | 43554598_41979 | 586,60 | 659,29 | 614,70 | 620,20 | 677,20 |
| 5 | 43554598_45809 | 636,58 | 605,33 | 613,42 | 618,44 | 660,81 |
| 6 | 43554598_80656 | 699,97 | 625,00 | 692,68 | 672,55 | 656,62 |
| 7 | Padrao3_7698 | 561,13 | 543,74 | 545,92 | 550,26 | 556,00 |
| 8 | PadraoFeZn1_7698 | 793,43 | 829,53 | 803,27 | 808,74 | 786,60 |
| 9 | PadraoFeZn2_7698 | 755,60 | 777,02 | 745,92 | 759,51 | 773,10 |
| 10 | PadraoFeZn3_7698 | 701,26 | 733,18 | 728,59 | 721,01 | 733,94 |
| 11 | PadraoFeZn4_7698 | 831,66 | 778,59 | 833,06 | 814,44 | 791,35 |
| 12 | PadraoFeZn5_7698 | 513,21 | 516,14 | 516,66 | 515,34 | 462,92 |
| 13 | PadraoFeZn6_7698 | 521,87 | 521,41 | 522,02 | 521,77 | 479,43 |
| 14 | PadraoZn1_7698 | 539,88 | 529,75 | 513,71 | 527,78 | 512,50 |
| 15 | PadraoZn2_7698 | 537,01 | 549,58 | 532,41 | 539,67 | 557,61 |
| 16 | PadraoZn3_7698 | 573,70 | 568,87 | 595,63 | 579,40 | 613,85 |
| 17 | PadraoZn4_7698 | 676,96 | 675,70 | 675,61 | 676,09 | 662,61 |
| 18 | PadraoZnup_98 | 902,12 | 880,47 | 872,74 | 885,11 | 821,27 |

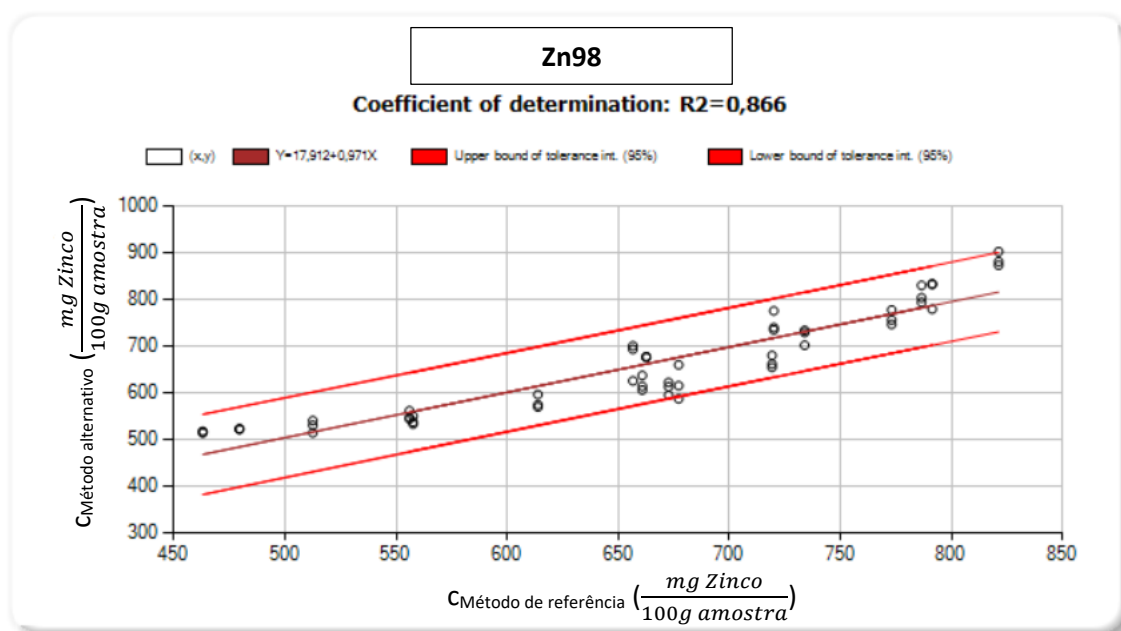


Figura 37 – Curva de calibração de zinco para a PM 98 gerada pelo software *QStat*. Estão representados os valores de concentração de zinco obtidos pelo método alternativo em função dos valores de concentração obtidos pelo método de referência, para cada uma das 18 amostras (54 replicados). São visíveis também os limites de confiança de 95% (a vermelho) e a regressão linear dos pontos obtidos (a castanho).

Tabela 34 – Gama de concentrações, regressão linear, número de pontos (n) e coeficiente de determinação (R²) de cada uma das curvas de calibração de zinco criadas.

| Curva de calibração | Gama de concentração ($\frac{mg\ Zinco}{100g\ amostra}$) | | Regressão linear | n | R ² |
|---------------------|---|--------|--|----|----------------|
| | Mín. | Máx. | | | |
| Zn75 | 229,43 | 438,36 | CMétodo alternativo ($\frac{mg\ Zinco}{100g\ amostra}$) = 0,878 x CMétodo de referência ($\frac{mg\ Zinco}{100g\ amostra}$) + 35,058 | 51 | 0,967 |
| Zn76 | 21,79 | 55,40 | CMétodo alternativo ($\frac{mg\ Zinco}{100g\ amostra}$) = 0,872 x CMétodo de referência ($\frac{mg\ Zinco}{100g\ amostra}$) + 5,067 | 45 | 0,911 |
| Zn98 | 462,92 | 821,27 | CMétodo alternativo ($\frac{mg\ Zinco}{100g\ amostra}$) = 0,971 x CMétodo de referência ($\frac{mg\ Zinco}{100g\ amostra}$) + 17,912 | 54 | 0,884 |

B.1 Análise à repetibilidade (exemplificada com o modelo Ca75)

Como foi referido no subcapítulo 4.5, a análise à repetibilidade foi feita em todos os modelos utilizando o *software* QStat. Este começa por calcular o limite de robustez para os desvios-padrão a 99%, tendo sido o valor calculado para o modelo Ca75 igual a 0,35. Assim, todas as amostras que tiverem desvios padrão entre os seus replicados superiores a este valor foram considerados *outliers* (a vermelho na Tabela 35).

Tabela 35 – Análise aos replicados de cada amostra em termos do desvio-padrão das concentrações medidas, para seleção de *outliers*.

| N | Amostra de calibração | Concentração calculada (%) | | | Média (%) | SD _N |
|----|-----------------------|----------------------------|-------|-------|-----------|-----------------|
| | | Rep 1 | Rep 2 | Rep 3 | | |
| 1 | 43604575_03329 | 11,3 | 11,2 | 11,2 | 11,2 | 0,058 |
| 2 | 43604575_14888 | 11,9 | 11,7 | 11,5 | 11,7 | 0,200 |
| 3 | 43604575_69083 | 11,6 | 11,2 | 11,9 | 11,6 | 0,351 |
| 4 | 43604575_81494 | 12,1 | 12,1 | 12,2 | 12,1 | 0,058 |
| 5 | 43604575_89166 | 11,3 | 12 | 11,8 | 11,7 | 0,361 |
| 6 | 43604575_93705 | 11,4 | 11,9 | 11,6 | 11,6 | 0,252 |
| 7 | 43604575_94528 | 11,8 | 11,6 | 11,6 | 11,7 | 0,115 |
| 8 | Padrão10_75 | 6,2 | 6,1 | 6,3 | 6,2 | 0,100 |
| 9 | Padrão11_75 | 6,2 | 6,2 | 6 | 6,1 | 0,115 |
| 10 | Padrão12_75 | 5,9 | 6,2 | 5,7 | 5,9 | 0,252 |
| 11 | Padrão13_75 | 6,1 | 6,2 | 5,8 | 6,0 | 0,208 |
| 12 | Padrão14_75 | 6,3 | 6,2 | 6,3 | 6,3 | 0,058 |
| 13 | Padrão15_75 | 6,3 | 6,2 | 6,5 | 6,3 | 0,153 |
| 14 | Padrão1_75 | 17,3 | 17,2 | 17,2 | 17,2 | 0,058 |
| 15 | Padrão2_75 | 16,4 | 16,2 | 16,6 | 16,4 | 0,200 |
| 16 | Padrão3_75 | 15,4 | 15,5 | 15,4 | 15,4 | 0,058 |
| 17 | Padrão4_75 | 14,5 | 14,3 | 14,6 | 14,5 | 0,153 |
| 18 | Padrão5_75 | 13,2 | 13,1 | 13 | 13,1 | 0,100 |
| 19 | Padrão6_75 | 10,8 | 9,7 | 10,5 | 10,3 | 0,569 |
| 20 | Padrão7_75 | 9,8 | 9,9 | 9,7 | 9,8 | 0,100 |
| 21 | Padrão8_75 | 8,3 | 8,9 | 8,2 | 8,5 | 0,379 |
| 22 | Padrão9_75 | 7,1 | 7,3 | 7,1 | 7,2 | 0,115 |

SD_N : desvio-padrão dos valores de concentração obtidos para os replicados da amostra N.

Foi feito um cálculo do desvio-padrão da repetibilidade (SD(r)) utilizando tanto a Estatística Clássica (Equação B.1) como a Estatística Robusta (Equação B.2).

$$SD(r) = \sqrt{\frac{\sum_{N=1}^{22} SD_N^2}{22}} \quad B.1$$

$$SD(r) = 1,2011 \times Med_{N=1, \dots, 22}\{SD_N\} \quad B.2$$

Os resultados obtidos foram bastante diferente utilizando as duas abordagens estatísticas (Tabela 36), evidenciando o peso que os *outliers* têm neste tipo de cálculo e a importância de utilizar uma abordagem de estatística robusta para que se obtenham resultados menos suscetíveis a resultados inesperados.

Tabela 36 – Resultados para os parâmetros de repetibilidade utilizando uma abordagem de estatística robusta ou clássica.

| Estatística Clássica | | Estatística Robusta | |
|-----------------------------|-------|----------------------------|-------|
| Média | 10,50 | Mediana | 11,40 |
| SD(r) | 0,22 | SD(r) | 0,16 |
| CV(r) | 2,1% | CV(r) | 1,4% |
| r | 0,62 | r | 0,45 |
| r% | 5,9% | r% | 3,9% |

CV(r) é o coeficiente de variação ($CV(r)=SD(r)/(Média\ ou\ Mediana)$), r é o limite de repetibilidade a 95% para os replicados ($r=2.772 \times SD(r)$) e r% é o limite de repetibilidade relativo a 95% para os replicados ($r\%=2.772 \times CV(r)$)