



FCTUC FACULDADE DE CIÊNCIAS
E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA



FMUC FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA



FFUC FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E ELEMENTAL NUM MODELO EXPERIMENTAL DE INTOXICAÇÃO COM METAIS PESADOS

ANA RITA BARROSO E SILVA

Universidade de Coimbra

Setembro de 2014

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química Forense, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor António Silvério Cabrita (Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra), da co-orientação da Professora Doutora Teresa Margarida Roseiro Maria Estronca (Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra) e da co-orientação do Dr. Rui José Fernandes Oliveira Manadas (Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Professora Doutora Teresa Pinho e Melo, Coordenadora do Mestrado em Química Forense na altura, pela oportunidade de trabalhar num tema escolhido por mim e, ainda, por me ter indicado ao Professor Doutor António Cabrita, permitindo que trabalhasse tanto na área da química como na área da medicina.

Ao meu Orientador, Professor Doutor António Cabrita agradeço, também, pela oportunidade de trabalhar em disciplinas pelas quais sempre existiu curiosidade. Ao nível académico, agradeço pela orientação e pelo apoio prestado nos momentos menos felizes deste projecto. Reconheço com gratidão a aceitação que prontamente disponibilizou para me integrar na sua equipa. Ao nível pessoal, gostaria de agradecer os conselhos, a amizade, sinceridade e disponibilidade que sempre teve para comigo. Penso que evoluí a nível intelectual, pessoal e social desde que integrei o equipa do Professor Doutor António Cabrita e, por isto, agradeço profundamente.

À minha Co-orientadora, Professora Doutora Teresa Roseiro, agradeço todas as questões colocadas pois permitiram-me avaliar cada fase deste projecto com extremo cuidado. Agradeço especialmente a orientação e apoio disponibilizados. Reconheço com gratidão a Professora Doutora Ermelinda Eusébio por todos os conselhos prestados. Foi uma honra tê-la como minha professora, pois penso que despertou, ainda mais, o gosto que tenho pela área dos métodos analíticos. Ao Professor Doutor Ricardo Castro agradeço por todos os conselhos e, ainda pela boa disposição que sempre foi bem-vinda durante este percurso. A estas três pessoas presto um agradecimento especial por me indicarem à UCQFarma (Unidade de Controlo de Qualidade de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra) e permitirem que continuasse este projecto.

Agradeço especialmente à UCQFarma e, particularmente, ao Director da FFUC, Professor Doutor Francisco José de Baptista Veiga e à Professora Doutora Maria Eugénia Soares Rodrigues Tavares de Pina pela oportunidade de finalizar o meu projecto num laboratório de alta qualidade, não só a nível de condições de trabalho mas como de equipamentos. Ao meu Co-orientador, Dr. Rui Manadas gostaria de agradecer, também, pela

oportunidade de trabalhar na UCQFarma. Reconheço com gratidão todo o apoio e orientação prestada na área em que tive tanto prazer em trabalhar, a química analítica. Agradeço toda a confiança depositada em mim pois permitiu-me ser autónoma e acreditar no meu valor profissional. Agradeço ainda, pela amizade demonstrada ao longo do período em que trabalhei na UCQFarma.

À Professora Doutora Filomena Santos agradeço por toda a preocupação e, ainda, pela orientação e conselhos prestados, embora exigentes são os mais apreciados. Reconheço com gratidão o Mestre Dr. Alexandre Trindade por todo o auxílio e orientação no processo de aprendizagem da técnica XRF. Agradeço profundamente a estas duas pessoas por me terem permitido apreciar a área da física de uma maneira que não pareceria possível para mim.

À Mestre Dra. Ana Rute Duarte, agradeço pela amizade, apoio e disponibilidade que sempre prestou para comigo. Agradeço não só pelo auxílio na realização da ração modificada, mas também pelo tratamento de animais e realização de necrópsias (principalmente em alturas pouco favoráveis).

Ao aluno do 3º ano do curso de Medicina, Gabriel Ferreira, agradeço a amizade, a companhia e apoio durante este projecto. Agradeço a ajuda prestada no tratamento das alfases, na realização das necrópsias e no processo histológico. Reconheço especialmente a sua vontade de trabalhar e aprender, pois permitiram-me uma motivação extra nos momentos menos felizes deste percurso.

Agradeço a todas as pessoas que trabalharam comigo durante este projecto que directa ou indirectamente me ajudaram a terminá-lo. À Mestre Dra. Nádia Cavaco pelo auxílio prestado na elaboração das necrópsias. Ao Mestre Dr. Osvaldo Évora e à Dra. Filipa Galego por todo o auxílio e disponibilidade na etapa de secagem das alfases. À Mestre Dra Ana Calado pela amizade e pela orientação na área da Histologia. Ao Dr. Gustavo Barandas pelo auxílio na aprendizagem dos procedimentos histológicos necessários para este projecto. Ao Dr. Miguel Marto pela ajuda prestada no tratamento dos animais. Ao Mestre Dr. Rodrigo Farinha pelo apoio prestado na fase de plantação.

Agradeço à Mélanie Gonçalves, Corina Reina e Sérgio Costa, não só pela companhia e conselhos que tanto me motivaram para a fase final deste percurso mas também, parti-

cularmente, ao Sérgio Costa, pelo o auxílio no transporte de amostras.

À Dona Isabel, funcionária da Faculdade de Medicina, um agradecimento muito especial e profundo por toda a boa disposição que apresenta todos os dias. Agradeço a força que me deu para continuar neste projecto mesmo sendo involuntária.

Ao Mestre Engenheiro Ricardo Cabeças agradeço profundamente a amizade, o apoio e a disponibilidade prestadas. Reconheço com especial gratidão todas as palavras encorajadoras que me ajudaram a continuar neste projecto até ao fim. Agradeço também pelo auxílio no tratamento das alfaces e animais. Um obrigado especial por me permitir olhar para um computador com outros olhos.

Reconheço com especial gratidão o Mestre Dr. Eduardo Costa pela amizade, apoio e disponibilidade que sempre me prestou. Agradeço profundamente todos os incentivos que me auxiliaram a nunca desistir deste percurso. Gostaria de agradecer também pelos ensinamentos ao nível dos processos histológicos e pelo tratamento das alfaces e animais.

Agradeço à Ana Isabel Ferreira e à Tânia Teixeira pela a amizade e apoio prestados ao longo deste percurso. Duas amizades realizadas num curto espaço de tempo mas que valorizo bastante. Agradeço ao Miguel Elias por todo o apoio e momentos felizes. Reconheço com especial gratidão Sara Rosa e Andreia Dias por todos estes anos de amizade e por me apararem nos momentos menos felizes deste percurso. Um profundo obrigado pela companhia e apoio.

Finalmente, um agradecimento muito especial à minha Mãe, ao meu Pai, ao meu Irmão, ao meu Tio, à minha Tia e ao meu Primo pela paciência que tiveram comigo pelos momentos em que não pude estar presente. Agradeço também todo o amor e carinho que sempre me motivaram e ajudaram a pensar que desistir não era possível. Agradeço particularmente à minha Mãe e ao meu Pai por me possibilitarem esta experiência em Coimbra que tanto me ajudou a evoluir pessoalmente e academicamente.

Aos meus avós, que estejam sempre comigo

Índice

Lista de Figuras	xiii
Lista de Tabelas	xix
Lista de Acrónimos	xxi
Introdução	1
Alimentação e a Saúde	1
Metais Pesados	3
Zinco	4
Cádmio	6
Chumbo	9
Identificação e Quantificação de Metais	10
Fluorescência de Raios-X	11
Espectroscopia de Absorção Atômica com Atomização em Câmara de Grafite	12
Digestão Ácida Assistida por Microondas	15
Morfofisiologia	17
Objectivos	18
Material e Métodos	21
Cultivo de <i>Lactuca sativa</i>	21
Secagem	24
Preparação da ração modificada para <i>Mus musculus</i>	24

Administração	25
Procedimento Histológico	27
Quantificação de Cd	29
Digestão Assistida por Microondas	29
Espectroscopia de Absorção Atômica com Atomização em Câmara de Grafite	30
Validação de Métodos	32
Selectividade	32
Linearidade e Gama de Trabalho	33
Limite de Detecção e Quantificação	34
Exactidão	35
Repetibilidade e Precisão Intermédia	36
Precisão do Sistema	37
Fluorescência de Raios-X	37
Resultados e Discussão	39
Morfologia	39
<i>Lactuca sativa</i>	39
<i>Mus musculos</i>	39
Validação de Métodos	41
Validação de método para determinação de Pb em Alface (<i>Lactuca sativa</i>)	41
Validação de método para determinação de Cd em <i>Lactuca sativa</i> (Alface)	42
Validação de método para determinação de Cd em órgãos de murganho (<i>Mus musculos</i>)	45
Quantificação de Cd	47
Fluorescência de Raios-X	48
Conclusão	71
Bibliografia	79
Anexos	85

Lista de Figuras

1	Consumo de hortícolas <i>per capita</i> de 2003 a 2012, em Portugal [2] - Imagem modificada	2
2	Poluição atmosférica, de partículas inferiores a 10 μm (t), em Portugal de 2002 a 2011 [3]	3
3	Sequência de acções para a plantação de pés de alface da primeira réplica realizada. 1 - Argila; 2 - Turfa; 3 - Substrato universal; 4 - Pés de alface . . .	22
4	Representação dos cortes efectuados na folha (1), caule e raíz (2), de cada pé de alface retirado para realizar estudo histológico	23
5	Estufa e bomba utilizada para realizar a secagem das alfaces	24
6	Alface seca da réplica 1, grupo contaminado	24
7	Grupo final controlo (CT) e teste (CM)	25
8	Ração modificada em forma de cilindro	25
9	Sala de necrópsias	26
10	Exemplo de blocos de parafina no estado sólido contendo tecido	27
11	Em cima apresenta-se o micrótomo e em baixo a placa fria utilizados	28
12	Digestor CEM modelo Discover [®] SP-D	30
13	Espectrofotómetro Analytik jena, modelo AAS ZEE nit 700	30
14	Equipamento de Fluorescência de Raios-X - Hitachi modelo SEA 6000VX .	38
15	A - Histologia da raíz do grupo controlo; B - Histologia da raíz do grupo contaminado (VCE)	39

16	A - Histologia do pulmão do grupo C2; B - Histologia do pulmão do grupo T2 (HE)	39
17	A - Histologia do rim do grupo T4; B - Histologia do rim do grupo C3 (HE) . .	40
18	A - Histologia do fígado do grupo C2; B - Histologia do fígado do grupo T2 (HE)	40
19	A - Histologia do coração do grupo C2; B - Histologia do coração do grupo T4 (HE)	40
20	Curva de calibração utilizada para estudar a linearidade e gama de trabalho do chumbo	41
21	Curva de calibração utilizada para estudar a linearidade e gama de trabalho do cádmio	43
22	Curva de calibração utilizada para estudar a linearidade e gama de trabalho do cádmio	45
23	Espectro obtido para uma amostra de fígado aplicando energia de 50 keV .	48
24	Espectro obtido para uma amostra de fígado aplicando energia de 15 keV .	48
25	Pico representativo do ferro	49
26	Pico representativo do ferro sem fundo	50
27	Picos característicos de P, S e Cl	50
28	Áreas de cps obtidas para a água destilada e solução contaminada; À esquerda encontram-se os resultados obtidos para energia de incidência de 15 keV; À direita a energia de incidência foi de 50 keV	51
29	Valores médios de áreas de cps obtidas para amostras de alface fresca para os grupos controlo e teste; À esquerda encontram-se os resultados obtidos para energia de incidência de 15 keV; À direita a energia de incidência foi de 50 keV	53
30	Valores médios de áreas de cps obtidas para amostras de alface seca para os grupos controlo e teste; À esquerda encontram-se os resultados obtidos para energia de incidência de 15 keV; À direita a energia de incidência foi de 50 keV	54

31	Valores médios de áreas de cps obtidas para o grupo controlo para amostras de alface fresca e seca; À esquerda encontram-se os resultados obtidos para energia de incidência de 15 keV; À direita a energia de incidência foi de 50 keV	54
32	Valores médios de áreas de cps obtidas para o grupo teste para amostras de alface fresca e seca; À esquerda encontram-se os resultados obtidos para energia de incidência de 15 keV; À direita a energia de incidência foi de 50 keV	55
33	Incidência de raios-X com energia de 50 keV	85
34	Incidência de raios-X com energia de 15 keV	86
35	Incidência de raios-X com energia de 50 keV para o grupo C01	87
36	Incidência de raios-X com energia de 15 keV para o grupo C01	87
37	Incidência de raios-X com energia de 50 keV para o grupo T03	88
38	Incidência de raios-X com energia de 15 keV para o grupo T03	88
39	Incidência de raios-X com energia de 50 keV para o grupo T04	89
40	Incidência de raios-X com energia de 15 keV para o grupo T04	89
41	Incidência de raios-X com energia de 50 keV para o grupo T05	90
42	Incidência de raios-X com energia de 15 keV para o grupo T05	90
43	Resultados obtidos para amostras de fígado irradiadas com radiação raios-X com energia de 50 keV	91
44	Resultados obtidos para amostras de fígado irradiadas com radiação raios-X com energia de 15 keV	92
45	Resultados obtidos para amostras de rim irradiadas na zona do córtex com radiação raios-X com energia de 50 keV	92
46	Resultados obtidos para amostras de rim irradiadas na zona do córtex com radiação raios-X com energia de 15 keV	93
47	Resultados obtidos para amostras de rim irradiadas na zona da medula com radiação raios-X com energia de 50 keV	93
48	Resultados obtidos para amostras de rim irradiadas na zona da medula com radiação raios-X com energia de 15 keV	94

49	Resultados obtidos para amostras de coração irradiadas com radiação raios-X com energia de 50 keV	94
50	Resultados obtidos para amostras de coração irradiadas com radiação raios-X com energia de 15 keV	95
51	Resultados obtidos para o grupo C01 irradiadas com radiação raios-X com energia de 50 keV	96
52	Resultados obtidos para o grupo C01 irradiadas com radiação raios-X com energia de 15 keV	97
53	Resultados obtidos para o grupo T03 irradiadas com radiação raios-X com energia de 50 keV	97
54	Resultados obtidos para o grupo T03 irradiadas com radiação raios-X com energia de 15 keV	98
55	Resultados obtidos para o grupo T04 irradiadas com radiação raios-X com energia de 50 keV	98
56	Resultados obtidos para o grupo T04 irradiadas com radiação raios-X com energia de 15 keV	99
57	Resultados obtidos para o grupo T05 irradiadas com radiação raios-X com energia de 50 keV	99
58	Resultados obtidos para o grupo T05 irradiadas com radiação raios-X com energia de 15 keV	100
59	Resultados obtidos para amostras de fígado irradiadas com radiação raios-X com energia de 50 keV	101
60	Resultados obtidos para amostras de fígado irradiadas com radiação raios-X com energia de 15 keV	101
61	Resultados obtidos para amostras de rim irradiadas na zona do córtex com radiação raios-X com energia de 50 keV	102
62	Resultados obtidos para amostras de rim irradiadas na zona do córtex com radiação raios-X com energia de 15 keV	102
63	Resultados obtidos para amostras de rim irradiadas na zona da medula com radiação raios-X com energia de 50 keV	103

64	Resultados obtidos para amostras de rim irradiadas na zona da medula com radiação raios-X com energia de 15 keV	103
65	Resultados obtidos para amostras de coração irradiadas com radiação raios-X com energia de 50 keV	104
66	Resultados obtidos para amostras de coração irradiadas com radiação raios-X com energia de 15 keV	104
67	Resultados obtidos para o grupo C02 irradiadas com radiação raios-X com energia de 50 keV	105
68	Resultados obtidos para o grupo C02 irradiadas com radiação raios-X com energia de 15 keV	106
69	Resultados obtidos para o grupo C03 irradiadas com radiação raios-X com energia de 50 keV	106
70	Resultados obtidos para o grupo C03 irradiadas com radiação raios-X com energia de 15 keV	107
71	Resultados obtidos para o grupo T01 irradiadas com radiação raios-X com energia de 50 keV	107
72	Resultados obtidos para o grupo T01 irradiadas com radiação raios-X com energia de 15 keV	108
73	Resultados obtidos para o grupo T02 irradiadas com radiação raios-X com energia de 50 keV	108
74	Resultados obtidos para o grupo T02 irradiadas com radiação raios-X com energia de 15 keV	109

Lista de Tabelas

I	Metais essenciais no organismo humano [10]	4
II	Constituintes da alface (<i>Lactuca sativa</i>) em g por cada 100 g [37]; *por parte comestível	21
III	Representação da réplica, grupo, início de plantação e administração, fim de administração, dia de recolha e quantidade de pés de alface plantados .	23
IV	Programa do processador automático	27
V	Programa de temperatura da câmara de grafite com plataforma	31
VI	Soluções preparadas e analisadas; * Pesou-se 0,1 g de amostra	35

INE Instituto Nacional de Estatística

DNA Ácido Desoxirribonucleíco

XRF Fluorescência de Raios-X

GFAAS Espectroscopia de Absorção Atómica com Atomização em Câmara de Grafite

ICP-AES Espectroscopia de Emissão Atómica com Plasma Acoplado Indutivamente

ICP-MS Espectrometria de Massa Atómica com Ionização em Plasma Acoplado Indutivamente

FAAS Espectroscopia de Absorção Atómica com Atomização em Chama

HE Hematoxilina de Mayer e Eosina

VCE Violeta de Cristal e Eosina

LCO Lâmpada de Cátodo Oco

LD Limite de Detecção

LQ Limite de Quantificação

FR Factor de Resposta

Abstract

The well-being and possibility of a healthy life are connected with health, body and food. In a world that's constantly evolving both industrial and technological, the formation of pollutants that are invisible to the naked eye is increasing. They may have visible consequences in the short and long term.

It was conducted one experimental vegetal model and two experimental animal models. The experimental vegetal model included two lettuce (*Lactuca sativa*) groups, control and test. The control group was subjected to 5 mL of distilled water and the test group was subjected to the same volume of a solution with $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ and $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ at 50 ppm, 50 ppm e 100 ppm, respectively. The duration of this study was 23 days. These groups were harvest for an morfologic and elemental evaluation. To assess the consequences to feeding level, we conducted an experimental animal model (*Mus musculus*). This included the creation of five groups. C1 group was kept without any experimental manipulation. C2 and C3 groups were subjected to administration of control modified diet (prepared with control group's lettuce) for 5 and 10 days, respectively. T1 and T2 group were subjected to administration of test modified diet (prepared with test group's lettuce) for 5 and 10 days, respectively. The second experimental animal model included three groups, T2, T3 and T4 that were subjected to administration of contaminated water for 5, 10 and 15 days. C1 group was used in both aminal models. In all the involved animais were collected lung, liver, kidney and heart for morphological and elemental evaluation.

The elemental evaluation included quantification of Cd by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectroscopy and the demand of P, S, Cl, K, Fe, Cu, Zn, Cd and Pb by X-Ray Fluorescence. The first was performed in dry lettuce, lung, liver, kidney and heart and the second in fresh lettuce, dry lettuce, liver, kidney (cortex and marrow zones) and heart. Before the determination of cadmium was performed the methods validation for samples of lettuce and mouse organs. It was concluded that the methods used are valid. The determination of Pb and Zn was not performed for technical reasons. It was concluded that control modified diet did not contain Cd while the test modified diet contained 0.937 mg of Cd/kg of fresh lettuce. It was also detected Pb in dried contaminated lettuce by XRF. It is to be noted that the mice subjected to a solution

containing Cd, Pb and Zn at 5, 10 and 15 days appear to accumulate Zn in the liver and in the kidney's marrow zone . As for the mice subjected to control lettuce for 5 and 10 days can be concluded that there seems to be an accumulation of Zn in all organs studied. The mice that were subjected to administration of contaminated lettuce for 5 to 10 days seem to be accumulate Zn in the liver and in the kidney's marrow zone. It should be noted that in the organs of mice that were subjected to control and contaminated lettuce, no significant result were obtained for Cd (GFAAS and XRF) and Pb (XRF) according to the sensitivity and limitations of the techniques used. There were no significant morphological changes in lettuce control and test. It is interesting to note that, in general, appears to be morphological consequences although nothing can be said about the presence of Cd and Pb in organs of mice. It appears to exist morfological changes with modifications to the diet of mice although, in some cases, the presence of contaminants tend to aggravate those changes.

These results show that is necessary a detailed study of these metals and the duration of exposure.

Resumo

A saúde, corpo e alimentação estão interligados com bem-estar e a possibilidade de uma vida saudável. A evolução tanto a nível tecnológico como industrial origina a formação de poluentes que são invisíveis a olho nu, mas que podem ter consequências visíveis a curto e longo prazo.

Realizou-se um modelo experimental vegetal e dois modelos experimentais com animais. O modelo experimental vegetal consistia em dois grupos de alface *Lactuca sativa*, grupo controlo e grupo teste. O grupo controlo foi sujeito a 5 mL de água destilada e o grupo teste foi sujeito ao mesmo volume de uma solução com nitrato de cádmio ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$), nitrato de chumbo ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) e nitrato de zinco ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$) com concentrações de 50 ppm, 50 ppm e 100 ppm, respectivamente. Estes grupos permaneceram em estudo durante 23 dias. Posteriormente foram recolhidos para avaliação morfológica e elemental. Para avaliar as consequências ao nível alimentar, realizou-se um modelo experimental com animais (*Mus musculus*). Este foi constituído por 5 grupos. O grupo C1 foi mantido sem qualquer manipulação experimental. Os grupos C2 e C3 foram sujeitos a administração de ração modificada controlo (preparada com alface do grupo controlo) durante 5 e 10 dias, respectivamente. Os grupos T1 e T2 foram sujeitos a administração de ração modificada teste (preparada com alface teste) durante 5 e 10 dias, respectivamente. Para o segundo modelo experimental com animais constituíram-se três grupos, T2, T3 e T4 que foram sujeitos a administração de água contaminada durante 5, 10 e 15 dias. O grupo C1 foi utilizado nos dois modelos animais. De todos os animais envolvidos recolheram-se pulmão, rim, fígado e coração para avaliação morfológica e elemental.

A avaliação elemental envolveu a quantificação de Cd por Espectroscopia de Absorção Atómica com Atomização em Câmara de Grafite e a procura dos elementos P, S, Cl K, Fe, Cu, Zn, Cd e Pb por Fluorescência de Raios-X. A primeira foi realizada em alface seca, pulmão, rim, fígado e coração e a segunda em alface fresca, alface seca, fígado, rim (na zona do córtex e na zona da medula) e coração. Para a determinação de cádmio procedeu-se à validação das metodologias analíticas para amostras de alface e órgãos de murganho concluindo que os métodos utilizados estão validados. A determinação de Pb e Zn não foi realizada por motivos de ordem técnica. Concluiu-se

que a ração modificada controlo não continha Cd enquanto que a ração modificada teste continha 0,937 mg de Cd/kg de alface fresca. Observou-se também, a detecção de Pb em alface seca contaminada por XRF. É de referir que para os murganhos que foram sujeitos a uma solução com Cd, Pb e Zn durante 5, 10 e 15 dias parece existir Zn acumulado no fígado e na zona da medula do rim. Já para os murganhos sujeitos a alface controlo durante 5 e 10 dias pode concluir-se que parece existir uma acumulação de Zn em todos os órgãos estudados. Para os murganhos sujeitos a administração de alface contaminada durante 5 e 10 dias pode referir-se que parece existir uma acumulação de Zn no fígado e na zona da medula do rim. É de referir que nos órgãos de murganhos que foram sujeitos a alface controlo e contaminada não se obteve qualquer resultado significativo para os elementos de Cd (GFAAS e XRF) e Pb (XRF) de acordo com a sensibilidade e limitações das técnicas utilizadas. Não existiram alterações morfológicas significativas nos grupos de alface controlo e teste. É interessante referir que, no geral, parecem existir consequências ao nível morfológico embora nada se possa referir quando à presença de Cd e Pb nos órgãos de murganhos. Parecem existir alterações morfológicas com a mudança da dieta embora, em alguns casos, a presença de contaminantes pareça fazer evoluir gravemente essas alterações.

Estes resultados mostram que é necessário um estudo mais pormenorizado destes metais pesados e duração de exposição.

Introdução

Alimentação e a Saúde

Actualmente a alimentação e a saúde são temas que se interpenetram, pois é conhecido que a saúde se deve, em parte, à alimentação. Com a informação actual é possível ter cuidados com a alimentação para manter um corpo em condições saudáveis. É, também, conhecido que a alimentação além de contribuir para a saúde em termos gerais, pode ser uma boa componente terapêutica. Na nossa sociedade existem questões que por vezes superam a saúde - as razões económicas. Estas motivações permitem que, com demasiada frequência, surjam alimentos de fraca qualidade, confeccionados de forma errada apenas sustentados pela componente económica e não pela saúde.

De todos os produtos alimentares, os vegetais são aqueles que contêm a maior parte dos nutrientes essenciais para o metabolismo humano [1]. Ultimamente, tem ocorrido um aumento no interesse por hortas domésticas e pela procura de produtos rotulados como biológicos. Em Portugal, o consumo médio de produtos hortícolas tem vindo a aumentar ao longo dos anos (Figura 1). De acordo com o Instituto Nacional de Estatística (INE), o consumo de hortícolas *per capita* aumentou 5,8 % desde 2008 até 2012 [2].

[1] J. Santos, M. Oliva-Teles, C. Delerue-Matos, and M. Oliveira, "Multi-elemental analysis of ready-to-eat "baby leaf"vegetables using microwave digestion and high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry", *Food Chemistry*, vol. 151, pp.311-316, 2014

[2] Instituto Nacional de Estatística, "Balança Alimentar Portuguesa 2008-2012", Abril 2014

[5] Bi, Xiangyang and Feng, Xinbin and Yang, Yuangen and Li, Xiangdong and Shin, Grace PY and Li, Feili and Qiu, Guangle and Li, Guanghui and Liu, Taoze and Fu, Zhiyou, "Allocation and source attribution of lead and cadmium in maize (*Zea mays L.*) impacted by smelting emissions", *Environmental Pollution*, vol. 157, no. 3, pp. 834-839, 2009

[6] M. Intawongse and J. R. Dean, "Uptake of heavy metals by vegetable plants grown on contaminated soil and their bioavailability in the human gastrointestinal tract", *Food additives and contaminants*, vol. 23, no. 1, pp. 36-48, 2006

[7] S. Demirel, M. Tuzen, S. Saracoglu, and M. Soylak, "Evaluation of various digestion procedures for trace element contents of some food materials", *Journal of hazardous materials*, vol. 152, no. 3, pp. 1020-1026, 2008

[8] K. Bakkali, N. R. Martos, B. Souhail, and E. Ballesteros, "Characterization of trace metals in vegetables by graphite furnace atomic spectrometry after closed vessel microwave digestion", *Food Chemistry*, vol. 116, no. 2, pp. 590-594, 2009

[9] Y. Yang, F. Li, X. Bi, L. Sun, T. Liu, Z. Jin, and C. Liu, "Lead, zinc, and cadmium in vegetables/crops in a zinc smelting region and its potential human toxicity", *Bulletin of environmental contamination and toxicity*, vol. 87, no. 5, pp. 586-590, 2011

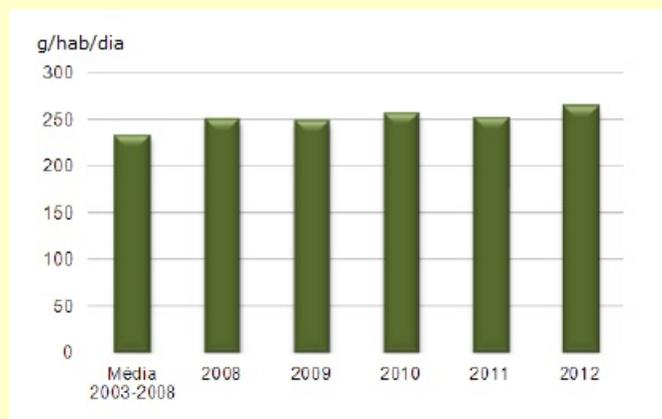


Figura 1: Consumo de hortícolas *per capita* de 2003 a 2012, em Portugal [2] - Imagem modificada

É conhecido que a água é um bem essencial à vida. Em Portugal continental, em 2010, existiu um consumo total de água de 4 199 milhões de m³, dos quais 81 % dizem respeito ao sector agrícola, 12 % ao sector urbano e 7 % ao sector industrial [3]. A maior parte da água de consumo em Portugal é considerada segura, no ano 2012, esta correspondia a 98 % [4].

A água e os vegetais são elementos importantes para o bem estar e saúde da espécie humana e animal, em geral. O cuidado da água e dos alimentos é, por isso, da maior importância para a saúde e bem-estar, devendo ser entendido como uma obrigação social de todos nós. Infelizmente, inúmeras vezes, existe pouco cuidado com estes bens essenciais para a vida. Por exemplo, os vegetais são, frequentemente, a principal via para a introdução de metais pesados na cadeia alimentar humana [5, 6]. Nesta era de grande evolução tecnológica e industrial [7], este tipo de contaminantes pode surgir de fertilizantes químicos, pesticidas, mineração e fundição de metais, tráfego, queimas de lixo e poluição atmosférica [6, 8, 9]. Estes depósitos constantes, acumulam-se em solos e águas e são absorvidos por todo o tipo de vegetação e produtos agrícolas. São de grande importância, as partículas atmosféricas

que são depositadas directamente nas folhas destes vegetais [5]. Em Portugal, após 2005, os poluentes atmosféricos com diâmetros inferiores a $10\ \mu\text{m}$ sofreram uma redução, atingindo em 2011 as 65 000 t, o valor mais baixo desde 2002 (Figura 2) [10].

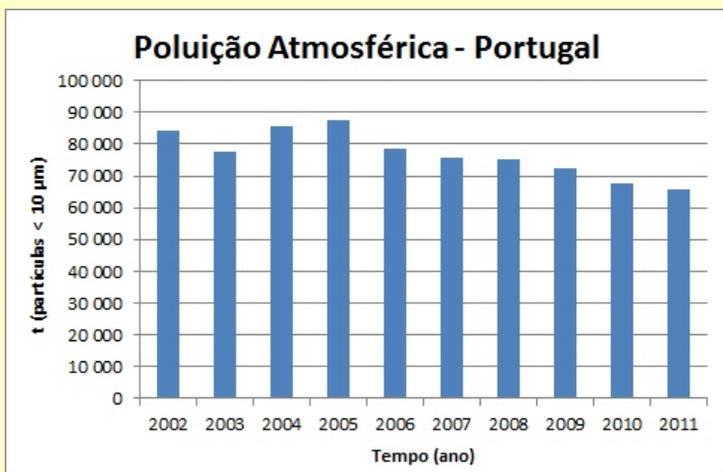


Figura 2: Poluição atmosférica, de partículas inferiores a $10\ \mu\text{m}$ (t), em Portugal de 2002 a 2011 [3]

As hortas domésticas e campos agrícolas realizados próximos de zonas de tráfego elevado podem constituir um perigo importante para a saúde, no que respeita à contaminação por metais pesados e existe tendência para procurar outras soluções.

Metais Pesados

A Tabela Periódica é constituída, maioritariamente, por metais, apenas 25 dos seus elementos não exibem as características para serem referenciados como tal [11]. Destes metais, existem os que são essenciais à vida, tal como o zinco e o ferro, pois participam em reacções bioquímicas e enzimáticas importantes para o normal funcionamento do corpo humano (Tabela I) [12].

[10] Gabinete de Estatística da União Europeia. <http://epp.eurostat.ec.europa.eu/portal/page/portal/environment/data/database>. (Pesquisa realizada a Junho de 2014)

[11] R. Chang, *Chemistry*, McGraw Hill, 10th ed., 2010

[12] R. A. Goyer, "Toxic and essential metal interactions", *Annual review of nutrition*, vol. 17, no. 1, pp. 37-50, 1997

[13] J. Harte, C. Holdren, R. Schneider, and C. Shirley, *Toxics A to Z: A guide to everyday pollution hazards*. Univ of California Press, 1991

[7] S. Demirel, M. Tuzen, S. Saracoglu, and M. Soyak, "Evaluation of various digestion procedures for trace element contents of some food materials", *Journal of hazardous materials*, vol. 152, no. 3, pp. 1020-1026, 2008

[14] O. D. Uluozlu, M. Tuzen, D. Mendil, and M. Soyak, "Assessment of trace element contents of chicken products from turkey", *Journal of hazardous materials*, vol. 163, no. 2, pp. 982-987, 2009

[15] C. R. Nwokocha, D. U. Owu, M. I. Nwokocha, C. S. Ufearo, and M. O. Iwuala, "Comparative study on the efficacy of *Allium sativum* (garlic) in reducing some heavy metal accumulation in liver of wistar rats", *Food and Chemical Toxicology*, vol. 50, no. 2, pp. 222-226, 2012

[16] World Health Organization (WHO), *Zinc in Drinking-Water, Guidelines for drinking-water quality*. 2nd ed, 2003

Metal	% (m/m)	Metal	% (m/m)
Cálcio	1,6	Cobalto	<0,05
Potássio	0,2	Cobre	<0,05
Sódio	0,1	Zinco	<0,05
Magnésio	0,05	Selénio	<0,01
Ferro	<0,05		

Tabela I: Metais essenciais no organismo humano [10]

Como se pode verificar estes elementos estão presentes em quantidades muito reduzidas (chamados em inglês "*trace metals*") [13]. Concentrações excessivamente elevadas de metais essenciais, durante um longo período de tempo, pode gerar efeitos tóxicos para o Homem [7, 14]. Os metais não-essenciais, que não apresentam nenhuma função benéfica no corpo humano, são muitas vezes associados a toxicidade, principalmente quando estes metais apresentam características quimicamente semelhantes a elementos essenciais [12].

Dentro do grupo dos metais não essenciais, alguns metais pesados, como chumbo e o cádmio, geram alguma preocupação. Os metais pesados são caracterizados por apresentarem uma densidade cinco vezes superior à da água [13]. Uma contaminação com estes metais pode originar efeitos cancerígenos, toxicidade ao nível do Sistema Imunitário e Neurológico [15].

Zinco

Este metal pesado está presente, na sua forma pura e em quantidades vestigiais, nos solos e nas rochas vulcânicas [16]. O zinco combina-se, rapidamente, com outros metais, logo é aproveitado para a formação de ligas metálicas, especialmente, as resistentes à corrosão. É utilizado na galvanização do aço, na pro-

dução de latão e de bronze [16, 17]. Um composto muito importante é o óxido de zinco pois é utilizado como pigmento branco na produção da borracha, em papel de fotocópias e no tratamento de problemas dermatológicos, tais como, queimaduras, eczemas e infecções [13, 16]. O cloreto de zinco é utilizado em bombas de fumo [13] e os carbamatos de zinco em pesticidas [16].

A exposição a este metal ocorre, maioritariamente, pela alimentação. As principais fontes de zinco na dieta são a carne, o peixe, as aves, os produtos lácteos, os cereais, os grãos, os vegetais e os frutos, embora estes últimos três contribuam com menores concentrações do que os primeiros [13, 16]. Para os adultos, a dose diária recomendada é entre 12 a 15 mg de zinco. Este valor pode subir 10 % quando existe contaminação da água de consumo por corrosão da canalização envolvida no transporte da mesma [16].

Sendo um metal essencial, o zinco está presente na constituição de quase 200 enzimas, tais como, polimerases, desidrogenases, fosfatases, peptidases e anidrases. Está envolvido no metabolismo de proteínas e ácidos nucleicos e é essencial para a síntese de DNA [13, 16, 18]. As suas funções principais são a regeneração e proliferação de células, reparação de tecidos e a protecção contra o *stress* oxidativo [19]. A taxa de absorção do zinco pelo corpo humano é muito variável (10-90 %) [16], já pelas plantas é rapidamente absorvido devido à sua mobilidade nos solos [6]. Este elemento acumula-se em tecidos como a próstata, músculos, ossos e fígado. A sua excreção é realizada, maioritariamente, pelo tracto gastrointestinal e, em quantidades inferiores, pela urina e suor. O tempo de permanência do zinco no organismo humano é de um ano. Este elemento apresenta uma acção protectora contra os efeitos tóxicos do cádmio e chumbo [16]. Assim, por todas as razões mencionadas em cima, este metal gera maior preocupação quando está em falta do que quando está em excesso [13].

[17] P. Parsons and G. Dixon, *The periodic table: A field guide to the elements*. Quercus Publishing Inc., 2014

[13] J. Harte, C. Holdren, R. Schneider, and C. Shirley, *Toxics A to Z: A guide to everyday pollution hazards*. Univ of California Press, 1991

[18] F. Z. UKBAY and E. Kuyumcu, "Determination of trace element contents of *Tyhmus* species from Turkey", *Turk J Chem*, vol. 34, pp. 911-919, 2010

[19] Z. Kayaalti, G. Mergen, and T. Söylemezoğlu, "Effect of metallothionein core promoter region polymorphism on cadmium, zinc and copper levels in autopsy kidney tissues from turkish population", *Toxicology and applied pharmacology*, vol. 245, no. 2, pp. 252-255, 2010

[6] M. Intawongse and J. R. Dean, "Uptake of heavy metals by vegetable plants grown on contaminated soil and their bioavailability in the human gastrointestinal tract", *Food additives and contaminants*, vol. 23, no. 1, pp. 36-48, 2006

[14] O. D. Uluozlu, M. Tuzen, D. Mendil, and M. Soylak, "Assessment of trace element contents of chicken products from turkey", *Journal of hazardous materials*, vol. 163, no. 2, pp. 982-987, 2009

[16] World Health Organization (WHO), *Zinc in Drinking-Water, Guidelines for drinking-water quality*. 2nd ed, 2003

[20] World Health Organization (WHO), "Exposure to Cadmium: A Major Public Concern", 2010

[13] J. Harte, C. Holdren, R. Schneider, and C. Shirley, *Toxics A to Z: A guide to everyday pollution hazards*. Univ of California Press, 1991

[21] World Health Organization (WHO), *Cadmium in Drinking-Water, Guidelines for drinking-water quality*. 2011

A deficiência deste metal pode originar pele seca e áspera, perda de apetite e danos ao nível sistema imunológico. Efeitos como nanismo, hipogonadismo, dermatite e morte, podem surgir, se a falta de zinco se tornar crónica [13, 14, 18]. Concentrações elevadas deste elemento podem ocorrer devido ao consumo excessivo de sais de zinco, tanto acidentalmente como propositalmente, por exemplo, ingerindo complementos alimentares. A ingestão exagerada de zinco pode provocar cólicas, náusea, vômitos, diarreia e febre. A inalação de fumos de zinco pode causar lesões pulmonares, arrepios, suores, febre, fraqueza e gastroenterite [13, 16].

Cádmio

No ambiente este metal está presente em concentrações muito reduzidas, mas, ao longo dos anos, a actividade humana tem contribuído para o seu aumento. Actividades naturais como erupções vulcânicas, desintegração de rochas, erosão ou transporte fluvial são responsáveis pelo aparecimento pontual de cádmio [20]. Este é um elemento semelhante ao zinco e é resistente à corrosão [13], logo é muito utilizado na galvanização do aço e em agentes anti-corrosivos [21]. Actividades humanas como mineração, fundições, refinarias, queima de combustíveis fósseis, lixos municipais, electrónicos e médicos, incineradores, tráfego e produção de fertilizantes contribuem para um aumento de cádmio no ambiente. Este metal está presente, também, em folhas de tabaco, tintas, baterias níquel-cádmio, em plásticos (como pigmento) e é utilizado como catalisador [13, 20]. O cádmio está presente na atmosfera sob forma de partículas, principalmente, de óxido de cádmio [21]. Este tipo de exposição é a de maior importância, pois este metal une-se a cinzas volantes, poeiras e sedimentos e, conseqüentemente, vai acumulando em solos e águas, chegando, finalmente, à cadeia

alimentar humana [13].

Este metal pesado tem a facilidade de se movimentar em solos e é rapidamente absorvido por plantas [6], sendo os vegetais uma das fontes principais de cádmio para o Homem. A alimentação, em geral, contribui para uma acumulação de 80 a 90 % do cádmio existente [13], em que, 70-90 % destes são contribuições que provêm de produtos hortícolas [22]. Os alimentos que apresentam maiores concentrações de cádmio são as espécies marinhas, como ostras, vieiras, moluscos e crustáceos, e órgãos de mamíferos, como rins e fígado. Os vegetais e cereais contêm teores mais baixos deste metal, mas sendo produtos alimentares com uma taxa de consumo elevada, relativamente aos anteriores, são a fonte principal de cádmio na alimentação humana [20]. Outras possíveis fontes de cádmio são a água, os cigarros e a poluição atmosférica [23]. A planta de tabaco acumula quantidades significativas deste metal [20], assim um indivíduo que fume um número médio diário de 20 cigarros está exposto a 2-4 μg de cádmio [21]. A exposição através da água é relativamente insignificante comparando com as restantes fontes. Apenas se torna problemático quando ocorrem danos nas canalizações que realizam o transporte de água potável e, se o pH da mesma for muito baixo. O cádmio tem uma percentagem de dissolução superior em águas com acidez elevada [21]. Sendo um metal tóxico, a concentração deste elemento em águas de consumo não pode exceder os 5,0 $\mu\text{g}/\text{L}$ [24] e o limite legal em produtos hortícolas de folha é 0,20 mg de Cd por kg de peso fresco [25].

O tempo de permanência deste metal no organismo humano é entre 10 a 35 anos, o que permite que ocorra uma acumulação excessiva ao longo do tempo [19–21]. Este elemento é absorvido pelo tracto gastrointestinal. Em indivíduos saudáveis, cerca de 3-7 %, do que é ingerido, é absorvido e transportado, pelo sangue, para qualquer parte do corpo. Os órgãos-alvo do cádmio são os

[6] M. Intawongse and J. R. Dean, "Uptake of heavy metals by vegetable plants grown on contaminated soil and their bioavailability in the human gastrointestinal tract", *Food additives and contaminants*, vol. 23, no. 1, pp. 36-48, 2006

[22] L. C. Melo, L. R. Alleoni, F. A. Swartjes, and E. B. da Silva, "Cadmium uptake by lettuce (*Lactuca sativa*) as basis for derivation of risk limits in soils", *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, vol. 18, no. 4, pp. 888-901, 2012.

[23] E. H. Jihen, M. Imed, H. Fatima, and K. Abdelhamid, "Protective effects of selenium (se) and zinc (zn) on cadmium (cd) toxicity in the liver and kidney of the rat: histology and cd accumulation", *Food and chemical toxicity*, vol. 46, no. 11, pp. 3522-3527, 2008

[24] *Decreto-Lei nº 306/2007 de 27 de Agosto do Diário da República, 1ª série, nº 164; Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional*

[25] *Regulamento nº 1881/2006 da Comissão Europeia de 19 de Dezembro de 2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios; Jornal Oficial da União Europeia*

[19] Z. Kayaalti, G. Mergen, and T. Söylemezoğlu, "Effect of metallothionein core promoter region polymorphism on cadmium, zinc and copper levels in autopsy kidney tissues from turkish population", *Toxicology and applied pharmacology*, vol. 245, no. 2, pp. 252-255, 2010

[21] World Health Organization (WHO), *Cadmium in Drinking-Water, Guidelines for drinking-water quality*. 2011

[20] World Health Organization (WHO), "Exposure to Cadmium: A Major Public Concern", 2010

[14] O. D. Uluozlu, M. Tuzen, D. Mendil, and M. Soylak, "Assessment of trace element contents of chicken products from turkey", *Journal of hazardous materials*, vol. 163, no. 2, pp. 982-987, 2009

[17] P. Parsons and G. Dixon, *The periodic table: A field guide to the elements*. Quercus Publishing Inc., 2014

[13] J. Harte, C. Holdren, R. Schneider, and C. Shirley, *Toxics A to Z: A guide to everyday pollution hazards*. Univ of California Press, 1991

rins e o fígado (50-85 % do cádmio ingerido) sendo que os rins acumulam entre 30 a 60 % deste valor [21]. O fígado é afectado em exposições pontuais, mas os rins são afectados em exposições prolongadas [19]. Assim que ocorre a ligação com a metalotioneína, responsável pelo transporte de metais no organismo, o cádmio é transportado até aos rins onde será filtrado. Durante esta filtração ocorre a quebra da ligação com esta proteína e, como consequência, é aumentada a sua produção para impedir a libertação de cádmio para o organismo. O primeiro efeito de uma exposição excessiva a este metal é a existência de teores elevados de metalotioneína na urina (proteinúria) [21]. Isto causa uma disfunção renal que, normalmente, é irreversível [20]. Para além de efeitos ao nível renal e hepático, podem ocorrer, ainda, ao nível ósseo, pulmonar, sistema imunitário e reprodutor [14, 20, 21].

A doença japonesa Itai-Itai, relacionada com intoxicação por cádmio, causa dores nos ossos e articulações. É uma doença antiga que originou devido à contaminação excessiva de águas e plantações de arroz nas proximidades de fábricas de fundição de zinco [17]. Absorção de quantidades elevadas de cádmio pode provocar alterações no metabolismo do cálcio e, conseqüentemente, enfraquecimentos dos ossos e osteoporose [20]. Relativamente ao sistema respiratório, inalação de fumos de cádmio pode causar enfisema, bronquite crónica e pneumonia. Uma exposição prolongada a estes fumos pode gerar carcinoma pulmonar [13, 20]. Estudos realizados em ratos mostram que uma exposição crónica a cádmio pode provocar cancro da próstata, do testículo e do fígado [21]. A ingestão de alimentos e bebidas com concentrações elevadas deste metal provocam vômitos, diarreia e choque [13]. A comissão europeia estabeleceu, em 2006, um limite de ingestão semanal admissível de 7 µg de cádmio/kg de peso corporal, devido à sua perigosidade para a saúde pública [25].

Chumbo

Antigamente, este metal era utilizado em reservatórios para conservação de alguns alimentos e em canalizações de transporte de água potável. Em 1921, a gasolina comercializada continha níveis elevados de chumbo [17]. Outras actividades humanas como fundições, minerações e lixos electrónicos contribuem para que os níveis de chumbo aumentem ao longo dos anos [26]. Devido a estas exposições continuadas, tanto a nível ambiental como social, surge a questão da toxicidade a nível mundial [17, 26]. Actualmente, a constituição da gasolina comercializada não inclui este elemento e, algumas tintas e cerâmicas deixaram de ser produzidas [17]. Este metal tóxico está presente em baterias, canalizações, tintas e cerâmicas (em concentrações reduzidas), revestimentos de telhados (devido à sua resistência à corrosão) e em protectores de radiação na região dos raios-X [17, 26]. Actividades naturais, como erupções vulcânicas e movimentos tectónicos contribuem para o aumento dos níveis de chumbo na crosta terrestre [26].

Este elemento é pouco solúvel em água e realiza interacções fortes com as algumas partículas do solo, o que determina que a sua taxa de absorção pelas plantas seja baixa. O seu meio de transporte principal é a atmosfera e é por esta via que as plantas e vegetais absorvem este tóxico [5, 13]. O limite legal estabelecido pela Comissão Europeia, em produtos hortícolas de folha é 0,10 mg de chumbo/kg de peso fresco e prevê, ainda, uma ingestão semanal admissível de 25 μg /kg de peso corporal [25]. Nas águas de consumo o limite legal estabelecido é 5 μg /L [24].

A exposição do Homem a este metal pode ocorrer de algumas formas, sendo que a alimentação representa a maioria. Dos produtos alimentares cerca de 50 % da exposição é originada de vegetais [6]. Os cereais e especiarias apresentam maior acumulação

[26] World Health Organization (WHO), "Exposure to Lead: A Major Public Concern", 2010

[25] Regulamento nº 1881/2006 da Comissão Europeia de 19 de Dezembro de 2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios; *Jornal Oficial da União Europeia*

[24] Decreto-Lei nº 306/2007 de 27 de Agosto do Diário da República, 1ª série, nº 164; Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional

[13] J. Harte, C. Holdren, R. Schneider, and C. Shirley, *Toxics A to Z: A guide to everyday pollution hazards*. Univ of California Press, 1991

[12] R. A. Goyer, "Toxic and essential metal interactions", *Annual review of nutrition*, vol. 17, no. 1, pp. 37-50, 1997

[7] S. Demirel, M. Tuzen, S. Saracoglu, and M. Soylak, "Evaluation of various digestion procedures for trace element contents of some food materials", *Journal of hazardous materials*, vol. 152, no. 3, pp. 1020-1026, 2008

[27] AEMITEQ - Associação para a Inovação Tecnológica e Qualidade, *Espectrofotometria de Absorção Atômica*, 1996

deste metal, o consumo bebidas ácidas, como por exemplo bebidas alcoólicas, e alimentos enlatados podem contribuir para um aumento da probabilidade de exposição a chumbo [26]. Poluição atmosférica, como o exemplo de queimas de gasolina e lixos, tráfego, são os segundos contribuintes para exposições excessivas a este elemento [13]. O chumbo ainda está presente nas folhas de tabaco, em alguns medicamentos e cosméticos. Contaminações derivadas de águas de consumo acontecem com maior probabilidade caso as tubagens e torneiras possam conter chumbo [26].

Após a sua absorção pelo organismo, o chumbo interage, principalmente, com os metabolismos do cálcio, ferro e zinco. Estas interações resultam num aumento deste metal no sangue, ossos, rins [12] cérebro e fígado. Numa exposição pontual, em concentrações elevadas, este elemento começa a demonstrar a sua toxicidade. Entre os sintomas estão perturbações gastrointestinais, como anorexia, náuseas, vômitos e dores abdominais, lesões renais e hepáticos, hipertensão e efeitos neurológicos, como por exemplo, mal-estar, sonolência e encefalopatia [26]. Exposição prolongada a este metal pesado pode causar anemia, dores de cabeça, irritabilidade, letargia, convulsões, fraqueza muscular, ataxia, tremores, paralisia e cancro [13, 26]. Para além dos sintomas e consequências já mencionadas, que tornam este metal um tóxico importante, a sua margem de segurança é muito reduzida, ou seja, a diferença entre concentrações consideradas tóxicas e as consideradas seguras é extremamente baixa [13].

Identificação e Quantificação de Metais

Tal como foi mencionado, a era em que vivemos é progressivamente industrial e tecnológica [7]. Isto provoca um impacto ambiental que implica uma avaliação cuidada dos elementos e compostos existentes nos alimentos, fármacos e no ambiente, em ge-

ral [27]. É fundamental que existam métodos de identificação e quantificação de metais, como Zn, Cd e Pb, pois representam um perigo para a saúde pública.

Fluorescência de Raios-X

A gama da radiação de raios-X é a região com comprimentos de onda entre 10^{-2} e 10 nm, com energias muito superiores ao visível. Esta radiação energética está associada a transições electrónicas nas camadas internas de um átomo [28].

Röntgen descobriu os raios-X em 1895 e retirou a primeira radiografia da história à mão da sua esposa. Em 1911, Barkla verificou que quando um elemento é estimulado por raios-X de energia adequada, emite uma radiação específica e característica desse mesmo elemento. Apenas nos anos 40, este tipo de radiação foi reconhecida como útil na identificação de elementos. Esta aplicação teve que aguardar pelo desenvolvimento tecnológico e de instrumentação para ser considerada uma técnica eficaz [29].

Um dado elemento que seja irradiado com uma radiação de energia adequada pode ser ionizado. Um fóton com energia suficiente tenderá a arrancar um electrão, o mais próximo possível do núcleo deixando uma lacuna no seu lugar. Esta lacuna, pode ser preenchida por electrões da camada seguinte ou mesmo de camadas mais afastadas. Estas transições originam a emissão de raios-X "característicos". As lacunas que se vão criando serão preenchidas desde a camada mais próxima do núcleo, até à mais afastada de modo a que o ião esteja novamente no estado fundamental [29, 30].

A técnica de análise por Fluorescência de Raios-X (XRF) permite a identificação de quase todos os elementos da tabela periódica. Elementos com número atómico inferior a 11 (sódio) apresentam energias de emissão de raios-X característico inferiores a

[28] R. D. Braun, *Introduction to Instrumental Analysis*. McGraw-Hill International Editions, 1987

[29] L. S. Birks, *X-Ray Spectrochemical Analysis*, vol. XI. U.S Naval Research Laboratory, Washington D.C.: Interscience Publishers, 1959

[30] A. S. P. de Sousa Moreno, *Non-destructive Characterization of Artworks in Paper Support Using Spectroscopic Techniques*. PhD thesis, Departamento de Física, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 2013

[31] G. L. Clark, *Physical Methods in Chemical Analysis*, vol. III. New York: Academic Press Inc. Publishers, 1956. (pág. 383-399)

[28] R. D. Braun, *Introduction to Instrumental Analysis*. McGraw-Hill International Editions, 1987

1 keV, não detectáveis na maioria dos equipamentos. Esta técnica é rápida e tem custos reduzidos relativamente a outras técnicas de identificação. As vantagens principais deste método de identificação são o facto de não ser destrutivo, não ser necessário tratamento prévio de amostra, é seguro, simples, a possibilidade de identificação de vários elementos numa medida e permite a utilização de amostras sólidas, líquidas e gasosas. A grande limitação da técnica de Fluorescência de Raios-X será a complexidade da interpretação dos espectros bem como a quantificação da abundância de cada elemento. Em amostras irregulares e com distribuição elementar heterogénea, torna-se impossível uma determinação quantitativa. A radiação de fundo também pode ser considerada uma desvantagem, pois está sempre presente em cada determinação. Esta consiste numa emissão de radiação pelos elementos constituintes do equipamento, da fonte de raios-X e plataformas de colocação de amostra [31].

Espectroscopia de Absorção Atómica com Atomização em Câmara de Grafite

Espectroscopia de Absorção Atómica é, maioritariamente, utilizada para análise quantitativa. É uma técnica de quantificação de átomos no estado gasoso por absorção, pelos mesmos, de radiação na zona de ultravioleta-visível (comprimentos de onda entre os 200 e os 800 nm). Esta técnica de espectrofotometria é aplicável a quase todos os metais incluídos na Tabela Periódica dos Elementos e, ainda, a alguns metalóides e não-metais, como é o exemplo do arsénio e selénio, respectivamente [28].

Em 1954, Walsh introduziu a técnica de Espectroscopia de Absorção Atómica em Chama na área da química analítica tornando-a útil e prática. Esta técnica consiste, resumidamente, na passagem de uma amostra líquida e homogénea para átomos gasosos,

no atomizador, onde passará a radiação UV-Vis. Esta é absorvida pelo elemento a quantificar na amostra e, a diferença energética é detectada e interpretada [27]. Em 1961, Boris V. L'vov inventou a câmara de grafite, um dos principais atomizadores utilizados para quantificação de metais [8, 18, 27].

A Espectroscopia de Absorção Atômica com Atomização em Câmara de Grafite foi uma descoberta revolucionária para a análise química. Comparando com atomização realizada com chama, a câmara de grafite permite a utilização de quantidades de amostra mais pequenas, da ordem dos μL , enquanto que a chama utiliza quantidades na ordem dos mL. A eficácia de atomização da chama é muito inferior à da câmara de grafite, pois esta permite a atomização total da quantidade de amostra introduzida. Outra grande vantagem da utilização deste atomizador é o tempo de permanência dos átomos gasosos na câmara, estes permanecem cerca de 1 s, enquanto que na atomização com chama apenas permanecem 10^{-4} s. A câmara de grafite apresenta uma sensibilidade duas vezes superior ao atomizador em chama, pois possibilita obter limites de detecção e quantificação muito reduzidos ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de amostra). A câmara de grafite é aquecida electricamente, o que garante um controlo de temperatura superior à chama e, assim, uma optimização da atomização com menores probabilidades de ocorrer ionização da amostra. Este fenómeno é uma das interferências do atomizador em chama [27, 28].

As desvantagens da utilização da câmara de grafite são o custo dos consumíveis, como as próprias câmaras, o gás inerte e electricidade [28]. Outras desvantagens, também encontradas nesta atomização, são as interferências de natureza química e de fundo. Interferências químicas surgem devido à presença de elementos na amostra que interferem com a capacidade de absorção por parte do elemento a quantificar. Estas são resolvidas com a adição de um modificador de matriz, este permite aumentar a volatilidade do

[8] K. Bakkali, N. R. Martos, B. Souhail, and E. Ballesteros, "Characterization of trace metals in vegetables by graphite furnace atomic spectrometry after closed vessel microwave digestion", *Food Chemistry*, vol. 116, no. 2, pp. 590-594, 2009

[18] F. Z. UKBAY and E. Kuyumcu, "Determination of trace element contents of *Tyhmus* species from Turkey", *Turk J Chem*, vol. 34, pp. 911-919, 2010

[27] AEMITEQ - Associação para a Inovação Tecnológica e Qualidade, *Espectrofotometria de Absorção Atômica*, 1996

[28] R. D. Braun, *Introduction to Instrumental Analysis*. McGraw-Hill International Editions, 1987

[32] K. S. Subramanian, "Determination of metals in biofluids and tissues: sample preparation methods for atomic spectroscopic techniques", *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, vol. 51, no. 3, pp. 291-319, 1996

[33] M. Lurdes Gonçalves, *Métodos Instrumentais para Análise de Soluções. Análise Quantitativa*. Fundação Calouste Gulbenkian, 2ª ed

[8] K. Bakkali, N. R. Martos, B. Souhail, and E. Ballesteros, "Characterization of trace metals in vegetables by graphite furnace atomic spectrometry after closed vessel microwave digestion", *Food Chemistry*, vol. 116, no. 2, pp. 590-594, 2009

[18] F. Z. UKBAY and E. Kuyumcu, "Determination of trace element contents of *Tyhmus* species from Turkey", *Turk J Chem*, vol. 34, pp. 911-919, 2010

interferente ou diminuir a volatilidade do analito [28,32]. Interferências de fundo são consequência de sobreposições de comprimentos de onda característicos. Cada elemento tem gamas de comprimento de onda característicos e certos elementos têm gamas muito próximas podendo interferir na absorção um do outro [27,28]. Estas interferências também podem estar associadas à absorção de radiação por parte de moléculas ou radicais que provêm da matriz da amostra [33]. As interferências de fundo podem ser contornadas recorrendo a correcções de fundo, como é o exemplo da correcção de Zeeman [27, 28, 33].

A Espectroscopia de Absorção Atómica com Atomização em Câmara de Grafite (GFAAS) é, no geral, a técnica de escolha para a realização de quantificação de elementos em quantidades vestigiais, em matrizes orgânicas [8, 18, 27]. É uma técnica com uma sensibilidade elevada relativamente a técnicas como Espectroscopia de Emissão Atómica com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-AES), embora não ultrapasse a técnica de Espectrometria de Massa Atómica com geração de iões em Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-MS). Comparando o custo da instrumentação de cada técnica a Espectrometria de Absorção Atómica com Atomização em Chama (FAAS) é a mais barata, seguindo-se a GFAAS. ICP-MS é a técnica com maior custo de instrumentação e consumíveis. No geral, GFAAS tem desvantagens, como a impossibilidade de leituras multi-elementares, é necessário a troca da lâmpada de cátodo oco conforme o elemento a analisar, o tempo de análise é elevado relativamente às técnicas já mencionadas. Caso o operador não tenha a vantagem de ter um injector automático, a injeção manual é uma desvantagem importante. A colocação da gota de amostra no interior da câmara de grafite é um passo crucial para a análise, caso não seja feita correctamente a atomização e a passagem do feixe através da amostra pode ser ineficaz [27, 28, 33].

A validação de métodos em química analítica é uma etapa im-

portante para obter resultados com uma qualidade elevada. Para que um método esteja devidamente validado é necessário avaliar a selectividade, linearidade, gama de trabalho, limites de detecção e quantificação, precisão, exactidão, precisão do sistema a utilizar e, ainda, a robustez. A utilização de Materiais de Referência Certificados permite uma validação directa do método a utilizar. É impossível proceder a qualquer análise química sem uma certeza de que os resultados a obter são válidos e de elevada confiança [33, 34].

Digestão Ácida Assistida por Microondas

O tratamento da amostra é uma fase muito importante em qualquer análise em química analítica. Quando é necessário realizar esta etapa para analisar uma dada amostra sólida, é importante que esta seja realizada com a certeza de que estamos a utilizar uma técnica ou método eficaz e eficiente. Em Espectroscopia de Absorção Atómica com Atomização em Câmara de Grafite tanto é possível utilizar amostras no estado líquido como no estado sólido, mas para impedir que ocorram interferências excessivas provocadas pela matriz, é preferível que as amostras estejam no estado líquido e que sejam homogéneas [32, 35, 36].

Se a amostra a analisar é, maioritariamente, constituída por matéria orgânica e o analito é inorgânico, como é o caso dos metais, é necessário realizar a destruição da matéria orgânica de modo a obter resultados precisos e exactos. Existem dois principais métodos com esse objectivo, digestão húmida e digestão seca [35]. Até recentemente, a utilização destes métodos era universal. A digestão húmida consiste na utilização de mistura de ácidos, placas quentes e recipientes abertos. É uma reacção que demora entre 2 a 24h, dependendo do tipo de amostra a digerir [32, 35, 36]. A digestão seca envolve a utilização de mufla e não é necessária a utilização de ácidos. Em 1975, Abu-samra e colaboradores utilizaram pela primeira vez um microondas convencional

[33] M. Lurdes Gonçalves, *Métodos Instrumentais para Análise de Soluções. Análise Quantitativa*. Fundação Calouste Gulbenkian, 2ª ed

[34] G. Relacre 13 *Validação de métodos internos de ensaio em análise química*, 2000

[32] K. S. Subramanian, "Determination of metals in biofluids and tissues: sample preparation methods for atomic spectroscopic techniques", *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, vol. 51, no. 3, pp. 291-319, 1996

[35] K. Lamble and S.Hill, "Microwave digestion procedures for environmental matrices. critical reviews", *Analyst*, vol. 123, no. 7, pp. 103R-133R, 1998

[36] F. E. Smith and E. A. Arsenault, "Microwave-assisted sample preparation in analytical chemistry", *Talanta*, vol. 42, no. 8, pp. 1207-1268, 1996

[32] K. S. Subramanian, "Determination of metals in biofluids and tissues: sample preparation methods for atomic spectroscopic techniques", *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, vol. 51, no. 3, pp. 291-319, 1996

[35] K. Lamble and S.Hill, "Microwave digestion procedures for environmental matrices. critical reviews", *Analyst*, vol. 123, no. 7, pp. 103R-133R, 1998

[36] F. E. Smith and E. A. Arsenault, "Microwave-assisted sample preparation in analytical chemistry", *Talanta*, vol. 42, no. 8, pp. 1207-1268, 1996

[8] K. Bakkali, N. R. Martos, B. Souhail, and E. Ballesteros, "Characterization of trace metals in vegetables by graphite furnace atomic spectrometry after closed vessel microwave digestion", *Food Chemistry*, vol. 116, no. 2, pp. 590-594, 2009

para realizar a digestão húmida de amostras biológicas [32, 35]. Desde que este estudo foi realizado, a evolução da utilização de microondas para a destruição de matéria orgânica tem vindo a evoluir [32, 35, 36].

As amostras biológicas, como os vegetais e órgãos, são, maioritariamente constituídas por hidratos de carbono, proteínas e lípidos [32, 35]. No processo de digestão ácida assistida por microondas pode-se utilizar apenas um ácido ou uma mistura de ácidos onde, aplicando um programa de temperatura, pressão e potência num recipiente fechado (normalmente), ocorre a digestão de matéria orgânica. Os hidratos de carbono são os primeiros a decompor-se aproximadamente a 140 °C, seguidos das proteínas a 150 °C e por fim os lípidos a 160 °C . O ácido de maior utilização é o nítrico (temperatura de ebulição é 120 °C, embora a pressões elevadas esse valor suba para 176 °C). Estas características permitem um aumento do seu potencial corrosivo e aceleração da reacção [36]. Relativamente aos métodos convencionais, a digestão assistida por microondas permite a utilização de menores quantidades de ácido (custos mais reduzidos) e de amostra, é um método rápido (de 10 min a 1 h), seguro, com baixa probabilidade de ocorrer contaminações e perdas de analitos voláteis. A utilização de recipientes fechados com o mecanismos de libertação de pressão é outra vantagem, pois permite que a pressão no interior do recipiente esteja dentro dos limites de segurança, com raras perdas de analito [8, 35, 36]. Este tipo de tratamento de amostra e o programa de temperatura a utilizar depende muito do tipo de amostra a digerir, do ácido ou mistura de ácidos a utilizar, do peso da amostra e volume de ácido(s). Esta desvantagem é facilmente contornada assim que se encontra um programa reprodutível, preciso, exacto e com boas recuperações de analito [36].

Morfofisiologia

A ciência desenvolveu-se nas últimas décadas com um aperfeiçoamento da morfologia macroscópica e microscópica e também com um melhor conhecimento do funcionamento dos corpos ao nível molecular. No contexto Fisiológico parece ser necessário aproveitar melhor os conhecimentos da área da física que podem ser aplicados.

Um aspecto igualmente da maior importância diz respeito à interação dos seres vivos com o ambiente externo e o realizado no sentido inverso. É necessário conhecer melhor, por exemplo, de que forma o ambiente externo, calor, frio e alimentação, por exemplo, podem interferir com o ser vivo em termos de estrutura e função. Sabe-se já que algumas situações que se desviam da saúde podem ter como factores causais o contacto com alguns produtos que têm uma acção lesiva sobre a estrutura e a função - os tóxicos. Também por isto, hoje pode aceitar-se como indispensável para a avaliação dos seres vivos o estudo morfológico, anatómico, histológico e molecular.

Todos estes factos são tomados em consideração quando se define uma situação experimental, que é um modelo de Patologia Experimental, suportado numa avaliação morfológica, estrutural e elemental. A Morfologia é ainda hoje o que determina a identificação de lesões, que se reconhecem como alterações histológicas. Avança-se agora para uma fase distinta, mas talvez complementar de encontrar alterações de elementos atómicos que podem justificar uma alteração estrutural e ser ponto de partida para alterações mais complexas do funcionamento dos tecidos. A utilização do murganho (*Mus musculus*), deve-se ao facto de ser um mamífero fácil de tratar em laboratório e com semelhanças estruturais e funcionais de forma a possibilitar algumas conclusões transponíveis para a espécie humana. É essencial, então, estudar a alimentação

e a produção alimentar mas não exclui situações que possam ser integradas em Patologia Forense

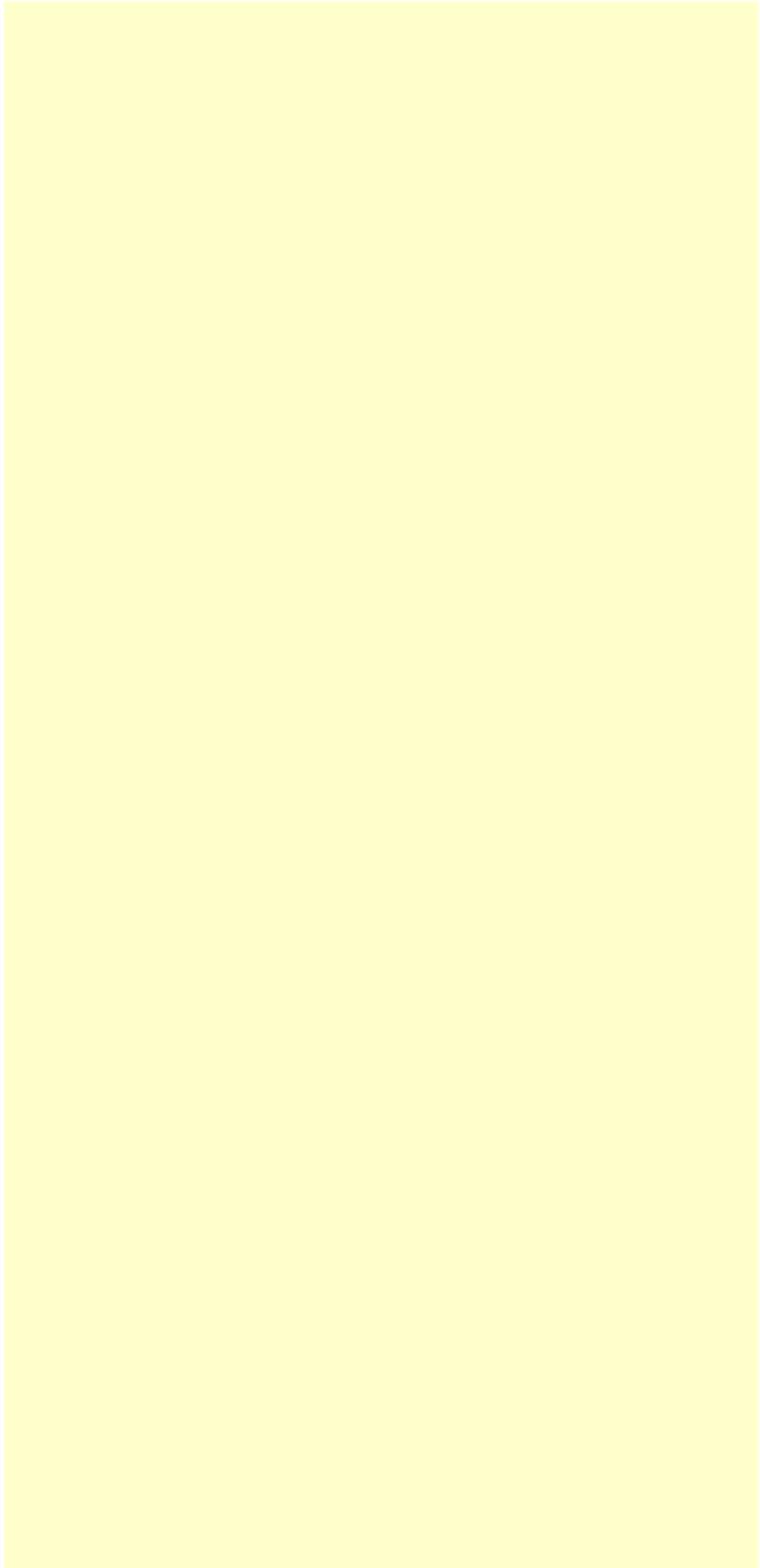
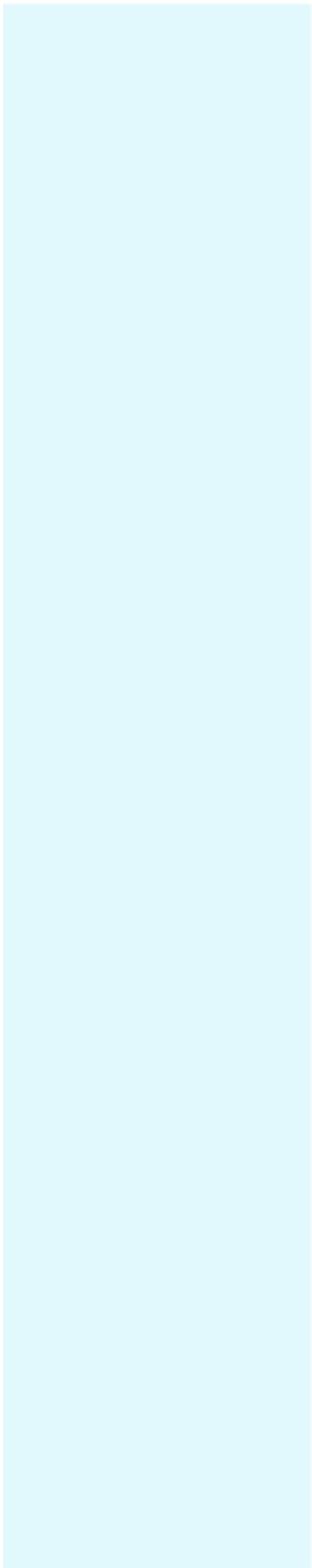
Objectivos

Nos dias de hoje, a sociedade tem preocupações com a saúde, corpo e alimentação. Estes três factores estão interligados com "felicidade" e bem-estar. O mundo em que vivemos está a evoluir tanto tecnologicamente como industrialmente e os poluentes formados são invisíveis a olho nu, mas com consequências visíveis a curto e longo prazo.

O objectivo deste estudo é entender que consequências certos contaminantes, como metais pesados (Cd, Zn e Pb), têm no organismo se entrarem na cadeia alimentar através de alimentos e água. O projecto tentou reproduzir uma possível contaminação de um tipo de produto hortícola, *Lactuca sativa* (alface), de modo a obter uma representação real de cultivos domésticos, perto de zonas fabris e/ou de tráfego elevado. Posteriormente, este vegetal é administrado a murganhos (*Mus musculus*) durante 5 e 10 dias. Este projecto tem como principal objectivo a comparação entre as consequências a nível morfológico, visualizadas com recurso a lâminas histológicas, e a detecção/quantificação de metais acumulados ao longo do período de administração. Pretende-se avaliar também as consequências com administração de água contaminada com metais pesados durante 5, 10 e 15 dias. Objectivos secundários serão avaliação de modificações microscópicas da morfologia da alface com e sem administração de contaminantes e avaliações breves sobre os métodos utilizados, tanto histológicos como de análise química, como o objectivo de prever estudos futuros e/ou alterações a este estudo.

É importante compreender que implicações os metais pesados têm como contaminantes presentes no nosso dia-a-dia e se é ne-

cessário accionar medidas de segurança próprias para o cultivo doméstico (em zonas de tráfego), cultivos perto de zonas fabris e vias rápidas.



Material e Métodos

Cultivo de *Lactuca sativa*

A alface (*Lactuca sativa*) é um tipo de produto hortícola constituído por água, proteínas, fibra alimentar e minerais, como, sódio, zinco, entre outros (Tabela II) [37]. Esta apresenta taxas de absorção de metais bastante elevadas relativamente a outros vegetais [6,22,38]. Para este projecto, escolheu-se este vegetal, não só pelos motivos mencionados mas, também, por ser cultivado todo o ano e ter uma popularidade elevada.

Componentes	Quantidade* (mg/100 g de alface)	Componentes	Quantidade (g/100 g de alface)
Sódio (Na)	3,0	Água	95,9
Potássio (K)	313	Proteína	1,8
Cálcio (Ca)	70	Gordura total	0,2
Fósforo (P)	46	Hidratos de carbono	0,8
Magnésio (Mg)	22	Fibra alimentar	1,3
Ferro (Fe)	1,5		
Zinco (Zn)	0,4		

Tabela II: Constituintes da alface (*Lactuca sativa*) em g por cada 100 g [37]; *por parte comestível

Em canteiros, plantaram-se 277 pés de alface divididos por 4

réplicas. Estas são definidas por plantações realizadas no mesmo local, sujeitas a condições de administração e tratamento semelhantes. As diferenças regem-se por plantações em épocas distintas (de Outubro de 2013 a Maio de 2014), por temperatura ambiente variada e, ainda, pela quantidade de pés de alface plantados por réplica. Para o cultivo de alface presente em cada grupo utilizaram-se os mesmos constituintes em cada canteiro (Figura 3): argila (*du vitor - argila expandida*), turfa (*delgarden - Fitossanitários*) e substrato universal (*ECO® Grow*).



Figura 3: Sequência de ações para a plantação de pés de alface da primeira réplica realizada. 1 - Argila; 2 - Turfa; 3 - Substrato universal; 4 - Pés de alface

Em cada réplica constituíram-se dois grupos, um grupo controlo e um grupo teste. O número de alfaces plantado em cada grupo foi o mesmo dentro de cada réplica. Ao grupo controlo foi administrado 5 mL de água destilada por dia e ao grupo teste foi administrado o mesmo volume de uma solução com nitrato de cádmio ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$), nitrato de chumbo ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) e nitrato de zinco ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$) (*Sigma-Aldrich*) com concentrações de 50 ppm, 50 ppm e 100 ppm, respectivamente [6, 25]. Cada administração foi re-

alizada directamente em cada pé de alface durante 23 dias (Tabela III).

Réplica	Grupo	Início de Plantação	Início da Administração	Fim da Administração	Recolha da Plantação	Quantidade
1	Controlo	12.10.2013	12.10.2013	03.11.2013	04.11.2013	13
	Teste	12.10.2013	12.10.2013	03.11.2013	04.11.2013	13
2	Controlo	16.11.2013	16.11.2013	08.12.2013	09.12.2013	46
	Teste	16.11.2013	16.11.2013	08.12.2013	09.12.2013	46
3	Controlo	24.02.2014	24.02.2014	18.03.2014	19.03.2014	50
	Teste	24.02.2014	24.02.2014	18.03.2014	19.03.2014	50
4	Controlo	24.04.2014	05.05.2014	27.05.2014	28.05.2014	30
	Teste	19.03.2014	21.03.2014	12.04.2014	13.04.2014	30

Tabela III: Representação da réplica, grupo, início de plantação e administração, fim de administração, dia de recolha e quantidade de pés de alface plantados

Em cada dia de recolha, escolheram-se, aleatoriamente, 3 pés de alface de cada grupo para realizar o estudo histológico. Lavou-se, cuidadosamente, com água destilada, retirando o excesso de terra, especialmente, na raiz. Posteriormente, separou-se a folha, o caule e a raiz, cortando cada um de acordo com a Figura 4.

Os tecidos cortados foram colocados, separadamente, em cassetes histológicas, devidamente identificadas. Estas foram armazenadas em fixador para plantas (FAA), constituído por 50 % (v/v) de etanol a 96 % (aga), 5 % (v/v) ácido acético glacial (*Merck, pro analysis*), 10 % (v/v) formaldeído a 37 % (*Merck, pro analysis*) e 35 % de água destilada. Um fixador tem como objectivo preservar as características fisiológicas do tecido durante um longo período de tempo, apenas por 48h ou meses [39, 40].

De cada pé de alface restante retiraram-se as folhas, uma a uma, lavando-se, cuidadosamente, com água destilada. O con-

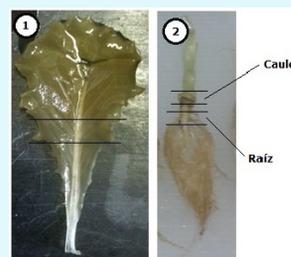


Figura 4: Representação dos cortes efectuados na folha (1), caule e raiz (2), de cada pé de alface retirado para realizar estudo histológico

[39] J. D. Bancroft and A. Stevens, *Theory and Practical of Histological techniques*. Churchill Livingstone, 4th ed.

[40] S. E. Ruzin, *Plant Microtechnique and Microscopy*. Oxford University Press, USA



Figura 5: Estufa e bomba utilizada para realizar a secagem das alfaces



Figura 6: Alface seca da réplica 1, grupo contaminado

[41] Decreto-Lei nº 113/2013 de 7 de Agosto do Diário da República, 1ª série, nº 164; Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional

junto de folhas de cada grupo foi pesado com o auxílio de uma balança (*Mettler modelo PJ3000*). Com o objectivo de reproduzir uma alimentação semelhante à do ser humano, recolheram-se, apenas, as folhas de alface pois são a parte comestível.

Secagem

Após a recolha das folhas de cada grupo é realizada a sua secagem [6, 22]. Com este procedimento é possível a homogeneidade das amostras de alface para as fases de detecção e/ou quantificação de metais e da sua administração a murganhos.

Esta etapa foi realizada numa estufa (*Heraeus*) que, com o auxílio de uma bomba (Figura 5), foi colocada sob vácuo com o objectivo de reduzir a pressão por forma a facilitar o processo de secagem, pois permite que a temperatura de ebulição da água baixe [11] e que a secagem da alface seja realizada mais rapidamente. A temperatura utilizada para a secagem de cada um dos grupos foi a temperatura de ebulição da água a 760 torr, 100 °C. O tempo de secagem de cada grupo é característico pois pretendeu-se garantir o seu peso constante com uma percentagem de desvio padrão relativo de 0,5 %.

Utilizaram-se as réplicas 1 a 3 para preparação da ração modificada para administrar aos murganhos. Com o objectivo de quantificar os metais (Cd, Pb, Zn) presentes nestas réplicas, recorrendo a GFAAS, procedeu-se à separação prévia de, aproximadamente, 0,53 g das réplicas 1 (Figura 6) e 2 e, aproximadamente, 1,30 g da réplica 3. A réplica 4, tanto fresca como seca, foi utilizada para a análise por XRF.

Preparação da ração modificada para *Mus musculus*

Na realização de qualquer ração modificada é necessário considerar o bem-estar do animal a utilizar [41]. Neste estudo teve-se

o cuidado com factores como a nutrição essencial aos murganhos e o aspecto da alimentação.

Com o objectivo de preparar apenas um tipo de ração modificada os grupos controlo e teste das réplicas 1 a 3 foram misturados, individualmente. O grupo final controlo é constituído por 3 % (m/m) da réplica 1, 13 % (m/m) da réplica 2 e 84 % (m/m) da réplica 3. Já o grupo final contaminado contém 14 % (m/m) da réplica 1, 25 % (m/m) da réplica 2 e 61 % (m/m) da réplica 3 (Figura 7). Para garantir que os animais envolvidos neste estudo obtivessem alimentação nutrida realizou-se a ração modificada com um rácio de 1:1 (ração comercial:alface fresca). Isto corresponde a 1,5 % de alface seca, tendo em conta que a percentagem de água presente na alface utilizada foi de, aproximadamente, 97 %.

Mantendo este rácio constante, realizou-se ração modificada controlo e ração modificada teste. A ração comercializada foi previamente pulverizada com o objectivo de facilitar a homogeneização com a alface seca. A esta mistura adicionou-se o volume mínimo possível de água para que a ração e alface ganhassem uma textura moldável. Ao grupo controlo adicionou-se 600 mL e ao grupo teste adicionou-se 1050 mL de H₂O destilada. Posteriormente, moldou-se a pasta adquirida em cilindros com tamanho relativamente semelhante aos que são comercializados (Figura 8) e colocou-se os mesmos na estufa (F.A.B.) a 75 °C de modo a obter um cilindro seco mas inteiro.

Administração

Constituíram-se 8 grupos, com um total de 43 murganhos (*Mus musculus*). No grupo I incluíram-se 8 animais do sexo masculino que foram mantidos sem qualquer manipulação experimental (C1). O grupo II, com 5 animais do sexo feminino, foi sujeito a adminis-



Figura 7: Grupo final controlo (CT) e teste (CM)



Figura 8: Ração modificada em forma de cilindro



Figura 9: Sala de necrópsias

tração de ração modificada controlo durante 5 dias (C2). O grupo III, constituído por 5 animais do sexo feminino, foi sujeito a administração de ração modificada controlo durante 10 dias (C3). O grupo IV, constituído por 5 animais do sexo masculino, foi sujeito a administração de ração modificada teste durante 5 dias (T1). O grupo V, constituído por 2 animais do sexo masculino e 3 animais do sexo feminino, foi sujeito a administração de ração modificada teste durante 10 dias (T2). O grupo VI, com 5 animais do sexo feminino, foi sujeito a administração de água contaminada durante 5 dias (T3). O grupo VII, com 5 animais do sexo feminino, foi sujeito a administração de água contaminada durante 10 dias (T4). O grupo VIII, com 5 animais do sexo feminino, foi sujeito a administração de água contaminada durante 15 dias (T5). A água contaminada administrada, foi utilizada de acordo com o procedimento *Cultivo de Lactuca sativa*. Tanto a água contaminada como as rações modificadas controlo e teste foram administradas *ad libitum*. Estas foram racionalizadas em porções diárias para garantir que existia ração modificada para a totalidade da duração do estudo. Posteriormente, todos os animais foram sacrificados e submetidos a uma necrópsia (Figura 9). Nesta realizou-se a recolha de pulmão, rim, fígado e coração com o objectivo de realizar a avaliação histológica, a detecção e/ou quantificação de cádmio, chumbo e zinco por GFAAS e XRF. Estes órgãos foram devidamente separados. Para a avaliação histológica foram colocados em casetes de histologia que, posteriormente, foram colocadas em fixador à base de formaldeído. Este é constituído por 0,40 % (m/m) de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (*Merck pro analysis*), 0,65 % (m/m) de Na_2HPO_4 (*Merck pro analysis*), 10 % (m/v) de CH_2O a 37 % e 90 % (m/v) de H_2O destilada. Para a detecção e/ou quantificação estes órgãos foram colocados, separadamente, em tubos de 1 mL que foram colocados numa arca frigorífica a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ (*PHILCO*).

Procedimento Histológico

Após a permanência no fixador durante o mínimo de 24 h, as amostras (em cassetes de histologia) foram colocadas no processador automático (*Citadel 1000*) - Tabela IV.

Etapa	Reagente	Tempo (h)
1	Formol	2
2	Formol	2
3	Etanol a 70%	1
4	Etanol a 96%	1
5	Etanol absoluto	1
6	Etanol absoluto	2
7	Etanol absoluto	2
8	Xileno	1
9	Xileno	1,5
10	Xileno	1,5
11	Parafina	2
12	Parafina	2

Tabela IV: Programa do processador automático

Para tecidos vegetais, realizou-se um processamento manual, apenas permanecendo 1h em cada reagente. Estes processamentos permitem hidratar o tecido de modo a que possa ser incluído em blocos de parafina. Este composto apresenta uma temperatura ideal de trabalho de, aproximadamente, 58 °C . Posteriormente realizou-se a inclusão que consiste em colocar o tecido no interior da parafina líquida e, com o auxílio de uma placa frio criar blocos de parafina sólida (*Shandon histocentrea*) que contêm o tecido (Figura 10).

Após o processo de inclusão realizou-se o corte dos tecidos.



Figura 10: Exemplo de blocos de parafina no estado sólido contendo tecido



Figura 11: Em cima apresenta-se o micrótomo e em baixo a placa fria utilizados

Este foi realizado num micrótomo Shandon modelo AS 325 Re-traction com uma placa fria Leica modelo EG 1130 (Figura 11). Os blocos de parafina frios foram cortados com uma espessura de 3 μm (ténia). Seguidamente, as ténias foram colocadas num banho-maria (*Kunz Instruments*), aproximadamente a 30 °C, com o objectivo de diminuir a rigidez da parafina. Posteriormente, as ténias são colocadas em lâminas microscópicas. Em cada lâmina colocou-se apenas um corte representativo de cada tecido avaliado neste estudo (pulmão, fígado, rim, coração). Finalmente, as lâminas são colocadas na estufa (F.A.B) a 60 °C durante 2 h. Posteriormente, cada lâmina é corado. Este procedimento foi realizado para tecidos vegetais e animais. A coloração realizada para as lâminas de tecido animal foi a coloração HE (Hematoxilina de Mayer-Eosina) que permite corar o grupos ácidos de roxo e os grupo básicos de rosa. Primeiramente, colocou-se as lâminas em xileno durante 20 min, seguidamente passou-se as lâminas por uma sequência de alcoois (Etanol absoluto (*aga*), Etanol a 70 % e Etanol a 30 %) e água destilada. Colocou-se, durante 15 min, as lâminas em Hematoxilina de Mayer e retirou-se o excesso de corante passando-as em água corrente. Seguidamente, as lâminas foram colocadas em Eosina, durante 5 min. Estas passaram novamente por Etanol a 70 % e Etanol absoluto, nesta ordem. Finalmente, as lâminas permanecem em xileno (*Merck Ensure[®]*) até serem montadas.

Para os vegetais realizou-se a coloração VCE (Violeta de Cristal-Eosina) que permite avaliar o seu tecido vascular. Para tal realizou-se os mesmos passos que na coloração anterior até à fase da água destilada. Posteriormente, colocou-se as lâminas em Violeta de Cristal a 1 % aq., durante 15 min. Retirou-se o excesso de corante passando as mesmas por água corrente. Seguidamente, colocou-se as lâminas durante 15 s em Etanol a 30 %, Etanol a 70 % e Etanol a 95 %. Posteriormente, as lâminas foram colocadas em

Eosina (em metil salicilato) durante 5 min. Colocou-se as lâminas numa solução 1:1 de Etanol absoluto:Xileno, durante 5 min. Finalmente, as lâminas permanecem em xileno até serem montadas.

Todas as lâminas foram avaliadas num Microscópio Nikon Eclipse modelo E600 e as suas fotografias foram retiradas no Microscópio Fotográfico Nikon Coolscope.

Quantificação de Cd

Lavagem de Material:

Quando um projecto envolve a quantificação de metais presentes em concentrações muito reduzidas existe uma probabilidade elevada de ocorrerem contaminações [27]. Para diminuir este risco, todo o material envolvido nos procedimentos mencionados a seguir foi lavado com o solvente utilizado (ácido nítrico (HNO_3) a 0,5 %). Numa primeira fase, o material foi lavado com HNO_3 a 0,5 %. Seguidamente, foi mergulhado numa tina com este solvente. Posteriormente, foi lavado e emergido numa tina com água ultrapura MilliQ (*Advantage Millipore MilliQ*; resistividade 18,2 M Ω cm). Esta etapa é repetida numa tina diferente. Seguidamente, o material foi lavado com HNO_3 a 0,5 % e, finalmente, por água ultrapura MilliQ directamente do equipamento. O material foi seco numa estufa (*Binder*) a 50 °C.

Digestão Assistida por Microondas

Numa balança analítica (*Denver Instrument modelo TB-2150*, máx 60 g e d=0,01 mg) pesou-se, aproximadamente, 0,1 g de alface seca para um recipiente de digestão (Pyrex[®]) e adicionou-se 5 mL de HNO_3 a 65% (*Panreac PA-ISO*, Pb 0,00002 %). Colocou-se um magneto e vedou-se o recipiente com uma tampa revestida



Figura 12: Digestor CEM modelo Discover® SP-D



Figura 13: Espectrofotômetro Analytik jena, modelo AAS ZEE nit 700

com PTFE. Correu-se um programa com duas etapas. A primeira aumenta a temperatura até 150 °C durante 3 min e permanece constante durante 2 min, a potência aplicada é de 300 W. Na segunda etapa ocorre um novo aumento de temperatura até 200 °C durante 3 min e 30 s, posteriormente permanece constante durante 5 min, a potência aplicada é de 200 W. A pressão máxima em ambas as etapas é de 200 psi. Este programa é realizado com agitação elevada permanente. Utilizou-se um digestor CEM modelo Discover® SP-D com o software Synergy Analytical versão 1.05.2 (Figura 12). Após a digestão colocou-se a solução digerida num balão volumétrico de 20 mL e aferiu-se com HNO₃ a 0,5 %. Esta solução foi diluída 10x com HNO₃ 0,5 %. Aplicou-se o mesmo procedimento para as amostras de pulmão, rim, fígado e coração, tendo em consideração que maior parte das amostras de pulmão e coração não atingiam o peso referido anteriormente.

Espectroscopia de Absorção Atômica com Atomização em Câmara de Grafite

Para a determinação de cádmio (Cd) utilizou-se uma lâmpada de cátodo oco (LCO) na linha principal com o comprimento de onda a 228,8 nm com uma corrente de 3 mA. Para a determinação de chumbo (Pb) utilizou-se uma LCO na linha principal com o comprimento de onda a 283,3 nm com uma corrente de 4 mA. Estas determinações foram realizadas num espectrofotômetro Analytik jena, modelo AAS ZEE nit 700 equipado com um injetor automático MPE60 e com o software WinAAS versão 4.7.7.0 (Figura 13). Utilizou-se o gás inerte árgon (Ar) e um volume de injeção de 20 µL. Tanto para determinações de Cd como de Pb utilizou-se o mesmo solvente, ácido nítrico (HNO₃) a 0,5 % e o mesmo modificador de matriz, dihidrogenogofato de amônia (NH₄H₂PO₄) a 1 % (*Organics*, 99,999 %, trace metals basic). Para a quantificação

de Cd todas as leituras de amostras e soluções foram realizadas duas vezes, já para a quantificação de chumbo foram realizadas três vezes.

Os programas de temperatura aplicados são dependentes do elemento a analisar (Tabela V).

Elemento	Etapa	Temperatura (°C)	Rampa de Temperatura (°C/s)	Tempo de permanência (s)	Árgon (Ar)
Cd	Secagem	90	5	20	Máx.
	Secagem	105	3	20	Máx.
	Secagem	110	2	10	Máx.
	Pirólise	800	250	10	Máx.
	Atomização	1300	1500	3	Nulo
	Limpeza	2300	500	4	Máx.
Pb	Secagem	90	5	20	Máx.
	Secagem	105	3	20	Máx.
	Secagem	110	2	10	Máx.
	Pirólise	900	250	10	Máx.
	Atomização	1500	1400	4	Nulo
	Limpeza	2300	500	4	Máx.

Tabela V: Programa de temperatura da câmara de grafite com plataforma

Utilizando uma solução mãe-padrão de Cd (*Fluka analytical, Sigma-aldrich*, 1000 mg/L \pm 4 mg/L), realizou-se a curva de calibração para o Cd com as seguintes concentrações: 0, 1, 2, 3, 4 e 5 ppb. Utilizando uma solução mãe-padrão de Pb (*Fluka analytical, Sigma-aldrich*, 1000 mg/L \pm 4 mg/L), realizou-se a curva de calibração para o Pb com as seguintes concentrações: 0, 5,0; 10, 20, 30, 40 e 50 ppb. As determinações de zinco (Zn) e de chumbo (Pb) em amostras não foram realizadas por razões de ordem técnica. A determinação de Cd em cada amostra foi realizada após a

validação do método.

Validação de Métodos

Para validar o método avaliou-se a selectividade, linearidade e gama de trabalho, limite de detecção (LD) e quantificação (LQ), exactidão, repetibilidade e precisão intermédia, e precisão do sistema. Realizou-se a validação do método para determinação de Cd em amostras de alface seca (*Lactuca sativa*) e em amostras de pulmão, rim, fígado e coração de murganho (*Mus musculus*). A validação do método para a determinação de Pb em amostra de alface seca (*Lactuca sativa*) foi começada mas por motivos de ordem técnica e problemas de contaminação não se conseguiu validar o método.

Selectividade

A selectividade permite avaliar a capacidade do método analítico de identificar especificamente o elemento a quantificar, independentemente de possíveis interferências químicas. Para tal prepararam-se quatro soluções: solução branco, solução padrão do elemento a quantificar numa dada concentração, solução-amostra e solução-amostra fortificada com o elemento a quantificar numa dada concentração. A solução branco foi preparada da mesma forma que a solução-amostra mas sem incluir a amostra.

Estas soluções foram sujeitas aos procedimentos incluídos nas secções *Digestão Assistida por Microondas e Espectrometria de Absorção Atómica com Atomização por Câmara de Grafite*. Para determinar Cd em amostras de alface seca preparou-se a solução padrão de cádmio e a solução-amostra fortificada com concentração de 3,30 ppb (concentração permitida por lei [25]). Para quantificar o mesmo elemento mas em amostras de órgãos de *Mus musculus* a concentração destas soluções foi 3,00 ppb. Para a de-

[25] Regulamento nº 1881/2006 da Comissão Europeia de 19 de Dezembro de 2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios; Jornal Oficial da União Europeia

terminação de Pb em alface seca, a concentração das mesmas soluções, de acordo com o que é permitido por lei [25], foi 16,65 ppb.

A avaliação da selectividade foi calculada recorrendo à seguinte equação:

$$\%_{\text{interferência}} = \left[\left(\frac{[P_F]}{A_{P_F}} \times \frac{A_{SA_F} - A_{SA}}{[SA]} \right) - 1 \right] \times 100 \quad (1)$$

Onde,

[P_F] - Concentração do elemento a determinar na solução padrão;

A_{P_F} - Absorvância da solução padrão do elemento a determinar;

A_{SA_F} - Absorvância da solução-amostra fortificada com o elemento a determinar;

A_{SA} - Absorvância da solução-amostra;

[SA] - Concentração do elemento a determinar na solução-amostra fortificada.

Critério de aceitação:

$\%_{\text{interferência}} \leq 20 \%$.

Linearidade e Gama de Trabalho

Para avaliar a linearidade e a gama de trabalho prepararam-se seis soluções padrão do elemento a determinar de acordo com o protocolo de realização de curvas de calibração na secção *Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização por Câmara de Grafite*. Para a determinação do cádmio as concentrações foram: 0,5; 1,0 ; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 ppb. Já para o chumbo as concentrações foram: 5,0; 10, 20, 30, 40 e 50 ppb. Nesta etapa é necessário avaliar o coeficiente de correlação e a percentagem relativa de absorvância da interceptação com o eixo do y da solução cuja concentração é 3,0 ppb para o Cd e 20 ppb para o Pb.

Critério de aceitação:

%intercepção com y: $\leq 10 \%$;

Coeficiente de correlação: $\geq 0,99$.

Limite de Detecção e Quantificação

O LD pode ser definido como a menor quantidade de analito na amostra que pode ser detectada mas não quantificada como um valor exacto. Já o LQ é definido como a menor concentração de analito na amostra que pode ser quantificada com um elevado grau de precisão e exactidão.

Realizou-se as curvas de calibração da mesma forma que na secção anterior. Para calcular os LD e LQ para o analito em questão recorreu-se às fórmulas seguintes:

$$LD = 3 \times \frac{S_{y/x}}{m} \quad (2)$$

$$LQ = 10 \times \frac{S_{y/x}}{m} \quad (3)$$

Onde,

$S_{y/x}$ - Desvio padrão da resposta;

m - Declive da curva de calibração.

Para verificar os valores obtidos preparou-se soluções padrão com as concentrações obtidas e mediu-se a sua absorvância. Para a verificação do LQ na amostra, prepararam-se três soluções-amostra independentes fortificadas com a concentração obtida para o LQ. Com estes valores obteve-se a percentagem de recuperação e o desvio padrão relativo das recuperações do limite de quantificação. A recuperação é calculada da seguinte forma:

$$\%_{\text{recuperação}} = \frac{[\text{Analito}]_i}{[\text{Analito}]_f} \times 100 \quad (4)$$

Onde,

$[\text{Analito}]_i$ - Concentração do analito na solução injectada no GFAAS (ppm);

$[\text{Analito}]_f$ - Concentração teórica do analito na solução (ppm).

Critério de aceitação:

$LD \leq LQ$;

LQ na solução-amostra \leq concentração selecionada na secção

Selectividade;

$\%_{\text{recuperação}}$: 85-115 %.

Exactidão

Esta etapa permite verificar qual a proximidade entre um aceite como correcto e o valor obtido pelo método analítico. A exactidão é expressa como uma percentagem da recuperação do valor teórico do analito em questão.

Nível	Concentração (ppb) - <i>alface seca</i>	Concentração (ppb) - <i>órgãos de murganho</i>	Volume Final* (mL)	Factor de Diluição	Nº de Soluções
Solução Amostra	-	-	20	10	2
1	1,5	1,5	20	10	3
2	3,3	3	20	10	6
3	3,5	3,5	20	10	3

Tabela VI: Soluções preparadas e analisadas; * Pesou-se 0,1 g de amostra

Avaliou-se a exactidão do método de determinação de Cd em amostras de alface seca e em amostras de órgãos de murganho.

Para cada método prepararam-se e analisaram-se as soluções referidas na Tabela VI. Para tal seguiu-se os protocolos referenciados nas secções *Digestão Assistida por Microondas* e *Espectrometria de Absorção Atómica com Atomização por Câmara de Grafite*. Este procedimento foi realizado num dia.

Para avaliar a exactidão do método calculou-se as percentagens de recuperação de analito de cada solução de acordo com a Equação 4 e o seu desvio padrão relativo.

Critério de aceitação:

%recuperação: 85-115 %;

Desvio padrão relativo: ≤ 10 %.

Repetibilidade e Precisão Intermédia

A precisão é obtida com base num conjunto de medidas que se adquirem de várias soluções que são preparadas de acordo com os protocolos propostos em *Digestão Assistida por Microondas* e *Espectrometria de Absorção Atómica com Atomização por Câmara de Grafite*. A repetibilidade permite avaliar a precisão dos resultados num curto espaço de tempo, já a precisão intermédia avalia a precisão interlaboratorial, pois os protocolos são realizados pelo mesmo analista em dias diferentes e por um segundo analista.

A repetibilidade foi avaliada com os resultados obtidos da etapa *Exactidão* para o nível dois da Tabela VI. Para a precisão intermédia realizaram-se duas soluções-amostra e seis soluções-amostra fortificadas com concentração igual à do nível dois da etapa de *Exactidão*. Isto foi realizado por dois analistas distintos. Analisaram-se estas soluções e calculou-se a percentagem de recuperação e o desvio padrão relativo para cada solução. Para avaliar a precisão intermédia comparou-se a média das recuperações obtidas pelos dois analistas e pelo mesmo analista em dias distintos.

Critério de aceitação:

%recuperação: 85-115 %;

Desvio padrão relativo (entre dias): ≤ 20 %;

%recuperação_Analista 1 - %recuperação_Analista 2: ≤ 20 %.

Precisão do Sistema

Com o objectivo de avaliar a precisão do Espectrofotómetro de Absorção Atómica Analytik jena, modelo AAS ZEE nit 700 preparou e analisou-se uma solução padrão do analito a determinar com uma concentração conhecida. No caso do método de determinação do cádmio tanto em alface seca como em órgãos de murganho a concentração foi de 3,00 ppb. No caso da determinação de chumbo em amostras de alface seca utilizou-se uma concentração de 16,65 ppb. Realizaram-se 6 medidas desta solução. Avaliou-se os valores obtidos calculando o desvio padrão relativo dos Factores de Resposta (FR).

$$FR = \frac{\text{Absorvência}}{\text{Concentração}} \quad (5)$$

Critério de aceitação:

Desvio padrão relativo: ≤ 10 %.

Fluorescência de Raios-X

Realizou-se a análise de diferentes tipos de amostras. Avaliou-se a assinatura elemental de água destilada, de solução de contaminantes (referida em *Cultivo de Lactuca sativa*), de alface controlo e teste tanto fresca como seca e de alguns órgãos recolhidos (rim, fígado e coração) de cada animal envolvido neste estudo. O rim, tendo duas estruturas histológicas, foi analisado na zona do córtex



Figura 14: Equipamento de Fluorescência de Raios-X - Hitachi modelo SEA 6000VX

e na zona da medula.

A análise por Fluorescência de Raios-X (*Hitachi modelo SEA 6000VX*) não necessita de tratamento de amostra: é uma técnica não-destrutiva (Figura 14). Com isto, todas as amostras mencionadas foram colocadas, individualmente, num suporte. Este é constituído por um paralelepípedo formado por compostos orgânicos (de baixo número atômico portanto não interferentes no resultado) que previne algumas interferências que provêm do suporte metálico do equipamento, como por exemplo do silício (Si). Fez-se incidir raios-X com energias de 15 keV e 50 keV em cada uma das amostras. Para energias mais baixas, como o exemplo dos 15 keV utilizou-se o gás inerte hélio (He), para que interferências relativas ao ar atmosférico, especificamente do gás árgon (Ar), fossem anuladas. Após a leitura, retirou-se a amostra do suporte, lavando-o com água destilada. Procurou-se fósforo (P), enxofre (S), cloro (Cl), potássio (K), ferro (Fe), cobre (Cu), zinco (Zn), cádmio (Cd) e chumbo (Pb).

Resultados e Discussão

Morfologia

Lactuca sativa

No geral, comparando o grupo controle com o grupo teste pode referir-se que este manifestou um crescimento mais rápido e de modo mais saudável, verificando-se poucas perdas de pés de alface. Histologicamente a observação da raiz, do caule e das folhas não mostrou diferenças significativas entre estes dois grupos (Figura 15).

Mus musculos

A histologia dos animais dos grupo C2 e C3 no que respeita ao pulmão mostra algumas alterações morfológicas em relação ao grupo controle. Observou-se estase e uma ligeira redução do espaço alveolar, e alguns casos, a presença de alveolites. Não há lesões bronquicas. Não se observaram diferenças significativas entre os grupos C2 e C3. No grupo T1 e T2 observam-se imagens de estase e em cerca de metade dos casos é evidente a presença de BAL. Estas observações são compatíveis com a presença de uma agressão tecidual, pulmonar, não existentes nos grupos anteriores. No grupo submetido à administração de água contaminada, apenas nos animais com administração mais prolongada, 15 dias,

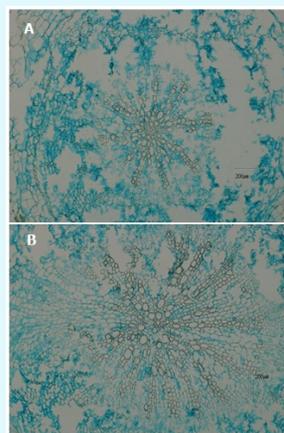


Figura 15: A - Histologia da raiz do grupo controle; B - Histologia da raiz do grupo contaminado (VCE)

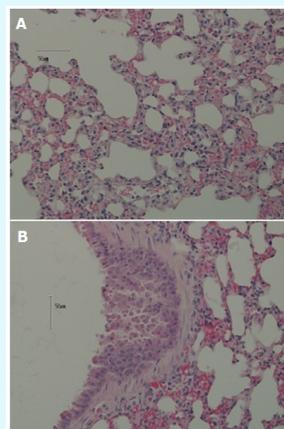


Figura 16: A - Histologia do pulmão do grupo C2; B - Histologia do pulmão do grupo T2 (HE)

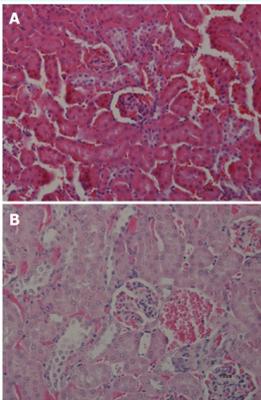


Figura 17: A - Histologia do rim do grupo T4; B - Histologia do rim do grupo C3 (HE)

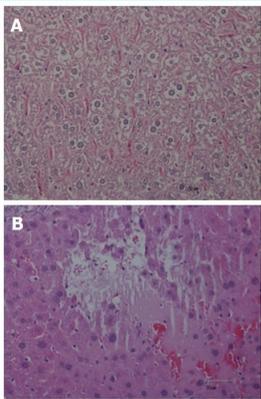


Figura 18: A - Histologia do fígado do grupo C2; B - Histologia do fígado do grupo T2 (HE)

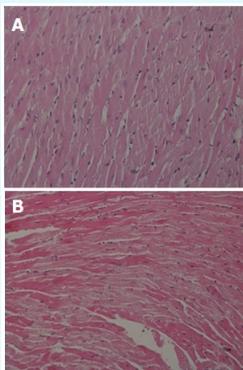


Figura 19: A - Histologia do coração do grupo C2; B - Histologia do coração do grupo T4 (HE)

se observaram imagens sugestivas de estase. Nos outros não há alterações significativas comparativamente com o grupo controlo (Figura 16).

No rim do grupo controlo verificou-se que não existem alterações morfológicas significativas. Nos animais em que foi administrada ração modificada controlo observa-se de uma forma constante a presença de estase, que parece mais evidente no grupo C3. Nos grupos em que se administrou ração modificada teste observa-se áreas extensas de estase. Para os grupos T3, T4 e T5 verificou-se áreas extensas de estase e em alguns casos a retracção do tufo glomerular (Figura 17).

Para o fígado não se verificam alterações morfológicas no grupo controlo. Comparativamente, os grupos administrados com ração modificada controlo apresentam vaculização acentuada variada. Este aspecto é semelhante no grupo T1 e T2 embora exista um caso com necrose e dois casos com infiltrado inflamatório focal. Nos grupos administrados com água contaminada pode verificar-se vaculização acentuada no grupo com menor tempo de exposição e a presença de alguma estase nos grupos com tempo de exposição mais elevado.

No coração, o grupo controlo não apresenta alterações morfológicas significativas. Os grupos C2 e C3 apresentam pequenos focos com alterações degenerativas do citoplasma e que em alguns casos parece haver estase relativamente ao grupo controlo. Os grupos T1 e T2 apresentam as mesmas alterações morfológicas. Nos grupos administrados com água contaminada, verificam-se pequenos focos com alterações degenerativas do citoplasma, parecendo mais significativas nos grupos com tempo de exposição mais elevado.

Validação de Métodos

Validação de método para determinação de Pb em Alface (*Lactuca sativa*)

Para avaliar a selectividade determinaram-se valores de absorvância para a solução padrão de Pb fortificada a 16,65 ppb, para a solução-amostra e para a solução-amostra fortificada com Pb (16,65 ppb). Utilizou-se a média destes valores para calcular a percentagem de interferência (Equação 1): -25 %. Este valor não está de acordo com os critérios de aceitação postulados.

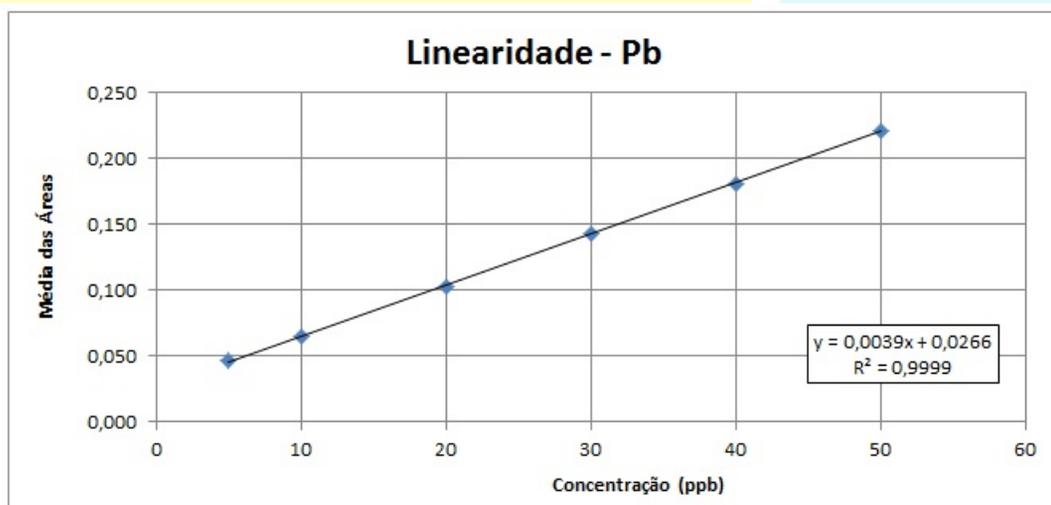


Figura 20: Curva de calibração utilizada para estudar a linearidade e gama de trabalho do chumbo

Para o parâmetro da linearidade e gama de trabalho traçou-se uma recta fazendo corresponder a cada valor de concentração estipulado (5,000; 10,00; 20,00; 30,00; 40,00 e 50,00 ppb) o seu valor médio de absorvância (Figura 20). Calculou-se a percentagem de interceptação de y e o coeficiente de correlação, 25 % e 0,999, respectivamente. O valor para o coeficiente de correlação está de acordo com os critérios de aceitação, já a % de intercep-

ção do y ultrapassou o valor de aceitação. Realizou-se uma curva de calibração por cada dia de trabalho.

Os limites de detecção e quantificação foram obtidos recorrendo às Equações 2 e 3 e à curva de calibração para o Pb. Obteve-se um limite de detecção de 0,793 ppb e um limite de quantificação de 2,642 ppb. Estes valores não foram verificados.

Posteriormente avaliou-se a precisão intermédia. Para tal, determinaram-se os valores médios de absorvância para cada solução realizada de acordo com o protocolo *Repetibilidade e Precisão Intermédia* (duas soluções-amostra e seis soluções-amostra fortificadas com chumbo a 16,65 ppb). Utilizando a Equação 4 e tendo em consideração cada massa pesada e a média das concentrações obtidas para as soluções-amostra, obteve-se a percentagem de recuperação de cada solução-amostra fortificada. Avaliou-se a sua média e o desvio padrão relativo. Obteve-se um valor médio de 115 % de recuperação de chumbo e um desvio padrão relativo de 25 %. O valor de recuperação está de acordo com os critérios de aceitação, mas o valor de desvio padrão apresenta-se muito elevado.

Os restantes parâmetros para validação do método não foram avaliados devido a problemas de contaminação e de ordem técnica.

Validação de método para determinação de Cd em Alface (*Lactuca sativa*)

Para a selectividade determinaram-se os valores médios de absorvância da solução padrão de Cd fortificada a 3,300 ppb, da solução-amostra e da solução-amostra fortificada com Cd (3,300 ppb). Obteve-se uma percentagem de interferência de -31 %. Este valor não está de acordo com os critérios de aceitação postulados.

Para o parâmetro da linearidade e gama de trabalho traçou-se

a curva de calibração para o Cd (Figura 21). Avaliou-se a percentagem de intercepção de y e o coeficiente de correlação, 36 % e 0,998, respectivamente. O valor para a % de intercepção do y não está de acordo com os critérios de aceitação, embora não aconteça o mesmo para o coeficiente de correlação. Foi efectuada uma curva de calibração por cada dia de trabalho.

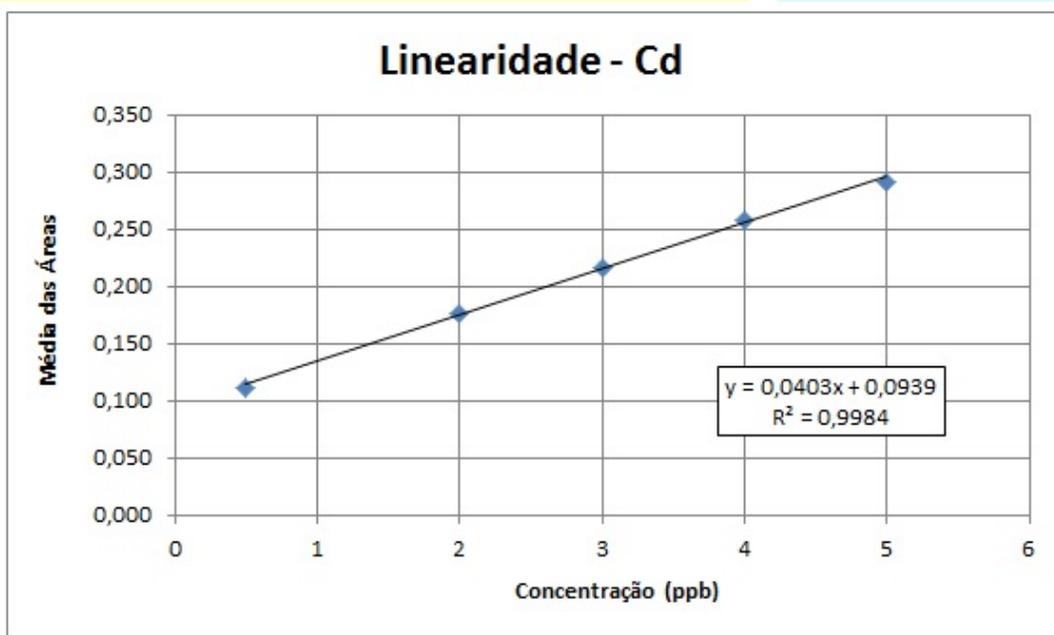


Figura 21: Curva de calibração utilizada para estudar a linearidade e gama de trabalho do cádmio

Para o limite de detecção obteve-se 0,242 ppb e para o limite de quantificação 0,806 ppb. Estes valores não foram verificados, devido ao facto de se conhecer aproximadamente os teores administrados aos grupos teste de alface.

Para a exactidão determinaram-se os valores médios de absorvância para cada solução preparada (Tabela VI). Utilizando a Equação 4 e tendo em consideração cada massa pesada e a média das concentrações obtidas para as soluções-amostra, obteve-se a percentagem de recuperação de cada solução-amostra for-

tificada. Avaliou-se a média e o desvio padrão relativo. Para as soluções do nível um obteve-se 92 % de recuperação de cádmio e um desvio padrão relativo de 1 %. Para o nível dois, uma % de recuperação de 107 % e um desvio padrão relativo de 4 %. Por fim, para o nível três a percentagem de recuperação foi também de 107 % e o desvio padrão relativo foi de 1 %. Para cada nível obtiveram-se valores que respeitam os critérios de aceitação.

Para avaliar a precisão intermédia foram determinados os valores médios de absorvância para cada solução preparada de acordo com o protocolo *Repetibilidade e Precisão Intermédia*. Calculou-se a percentagem de recuperação e o desvio padrão relativo tal como já foi mencionado. Obteve-se um valor médio de 110 % de recuperação de cádmio e um desvio padrão relativo de 1 %. Para a repetibilidade utilizaram-se os valores obtidos para a exactidão (nível 2) mencionados em cima. Posteriormente compararam-se os resultados obtidos em dias diferentes (precisão intermédia e repetibilidade) obtendo-se um desvio padrão relativo entre dias de 2 %. Avaliou-se também a diferença entre as % de recuperação para o Cd para dois analistas diferentes: 20 %. Todos os valores obtidos para a precisão estão acordo com os critérios de aceitação.

Avaliou-se a precisão do sistema calculando o Factor de Resposta (FR) para cada valor de absorvância obtido da solução fortificada a 3,000 ppb (Equação 5). Obteve-se um desvio padrão relativo de 1 %.

A selectividade e o valor obtido para a % de intercepção de y não foram validados. Estes dois parâmetros estão relacionados, pois quando a % de intercepção de y é elevada obtêm-se valores de ordenada na origem da curva de calibração elevados e, conseqüentemente, valores negativos para a concentração quando os valores de absorvância são muito baixos. Tendo em conta que a selectividade compara valores de absorvância de solução-amostra, obtêm-se valores negativos para a % de interferência.

Este fenómeno pode dever-se à influência da matriz, mas como valores adquiridos para a linearidade, precisão e exactidão estão dentro dos critérios de aceitação considerou-se que o método é selectivo e, conseqüentemente, foi validado.

Validação de método para determinação de Cd em órgãos de murganho (*Mus musculus*)

Para o estudo da selectividade obtiveram-se os valores médios de absorvância da solução padrão de Cd fortificada a 3,000 ppb, da solução-amostra e da solução-amostra fortificada com Cd (3,000 ppb). A percentagem de interferência, -26 %, não está concorde com os critérios de aceitação.

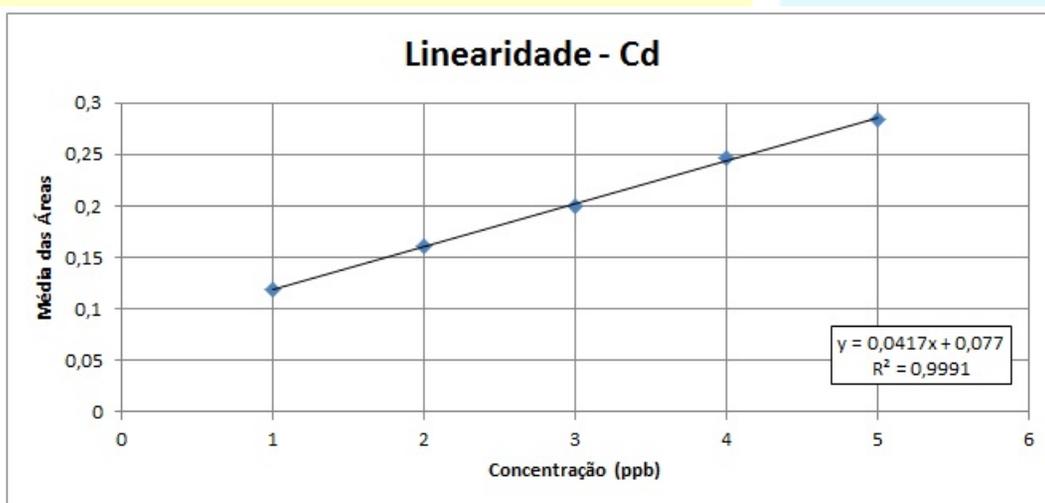


Figura 22: Curva de calibração utilizada para estudar a linearidade e gama de trabalho do cádmio

Para o parâmetro da linearidade e gama de trabalho, com o auxílio da curva de calibração para o Cd (Figura 22), obteve-se a percentagem de interceptão de y e o coeficiente de correlação, 38 % e 0,999, respectivamente. O coeficiente de correlação está dentro dos critérios de aceitação, já o valor para a % de interceptão do y não cumpre os critérios postulados.

Obteve-se um limite de detecção de 0,168 ppb e um limite de quantificação de 0,560 ppb. O valor de LQ foi verificado através dos valores de % de recuperação e desvio padrão relativo de soluções-amostra fortificados com cádmio a 1 ppb. A percentagem de recuperação obtida foi de 97 % e o valor de desvio padrão relativo foi de 3 %. Ambos os valores estão de acordo com os critérios de aceitação.

Para avaliar a exactidão realizou-se o mesmo tratamento de dados referido anteriormente. Para as soluções do nível um obteve-se 98 % de recuperação de cádmio e um desvio padrão relativo de 5 %. Para o nível dois, obteve-se 114 % de recuperação e um desvio padrão relativo de 6 %. Por fim, para o nível três a percentagem de recuperação foi 115 % e o desvio padrão relativo foi de 1 %. Estes valores respeitam os critérios de aceitação.

Para a precisão obteve-se um valor médio de 111 % de recuperação e um desvio padrão relativo de 3 %. Os valores obtidos estão dentro dos critérios de avaliação. Para a repetibilidade utilizaram-se os valores obtidos para a exactidão (nível 2) mencionados em cima. Avaliou-se a diferença entre as % de recuperação para o Cd para dois analistas diferentes: 16 %. Comparando os resultados obtidos em dias diferentes (precisão intermédia e repetibilidade) obtendo-se um desvio padrão relativo entre dias de 2 %. Ambos os valores estão concordantes com os critérios de aceitação.

Para precisão do sistema calculou-se o Factor de Resposta (FR) para cada valor de absorvância obtido da solução fortificada a 3,000 ppb (Equação 5). Obteve-se um desvio padrão relativo de 1 %. Este valor está de acordo com os critérios de aceitação.

Neste processo de validação, os valores obtidos para a percentagem de interferência e de intercepção do y também não estão concordantes com os critérios de aceitação e, tal como já foi mencionado, considerou-se que o método é selectivo e, consequentemente, foi validado. É de referir ainda que esta validação foi rea-

lizada com amostras de fígado, rim, pulmão e coração escolhidas aleatoriamente dentro de cada etapa a validar. Isto foi realizado com o objectivo de verificar se a matriz interferia igualmente em cada órgão.

Quantificação de Cd

Após a validação do método determinou-se a quantidade de cádmio existente nas amostras de alface seca das réplicas 1 a 3 e das amostras de pulmão, fígado, rim e coração dos animais incluídos nos grupos C01, C02, C03, T01 e T02 (os restantes grupos foram excluídos por motivos de ordem técnica).

Para cada amostra de alface realizaram-se duas alíquotas, já para as amostras de órgão de murganho realizou-se uma alíquota. Tomando em consideração que o tratamento de resultados foi o mesmo que se utilizou para a *Exactidão e Repetibilidade e Precisão Intermédia* apenas se apresentam os resultados obtidos.

Para as amostras de alface, para a todos os grupos controlo da réplica 1 a 3 obteve-se concentrações abaixo do limite de detecção. Para a réplica 1 obteve-se uma concentração de 0,529 ppm com um desvio padrão relativo de 8 %. Para a réplica 2, o grupo teste apresenta 0,520 ppm com um desvio padrão relativo de 11 %. Para o grupo teste da réplica 3 verificou-se um valor mais elevado: 2,735 ppm com um desvio padrão relativo de 3 %. Estes valores estão acima do que é permitido por lei [25]. Pode referir-se que a ração modificada controlo administrada aos murganhos não continha cádmio e a ração modificada teste continha 0,937 mg de Cd/kg de alface fresca. Já nas amostras de órgão de *Mus musculus*, para todos os grupos avaliados obteve-se concentrações abaixo do LD.

C1 - Grupo de 8 animais do sexo masculino que foram mantidos sem qualquer manipulação experimental;

C2 - Grupo de 5 animais do sexo feminino que foram sujeitos a administração de ração modificada controlo durante 5 dias;

C3 - Grupo de 5 animais do sexo feminino que foram sujeitos a administração de ração modificada controlo durante 10 dias;

T1 - Grupo de 5 animais do sexo masculino que foram sujeitos a administração de ração modificada teste durante 5 dias;

T2 - Grupo de 2 animais do sexo masculino e 3 animais do sexo feminino que foram sujeitos a administração de ração modificada teste durante 10 dias.

Fluorescência de Raios-X

Para cada amostra foram efectuadas duas análises, uma com energia incidente de 15 keV e outra com energia de 50 keV (Figuras 23 e 24). No eixo das ordenadas estão representados o número de contagens (de fótons) emitidos pela amostra em cada segundo (cps) e no eixo das abcissas a energia dos mesmos, em keV

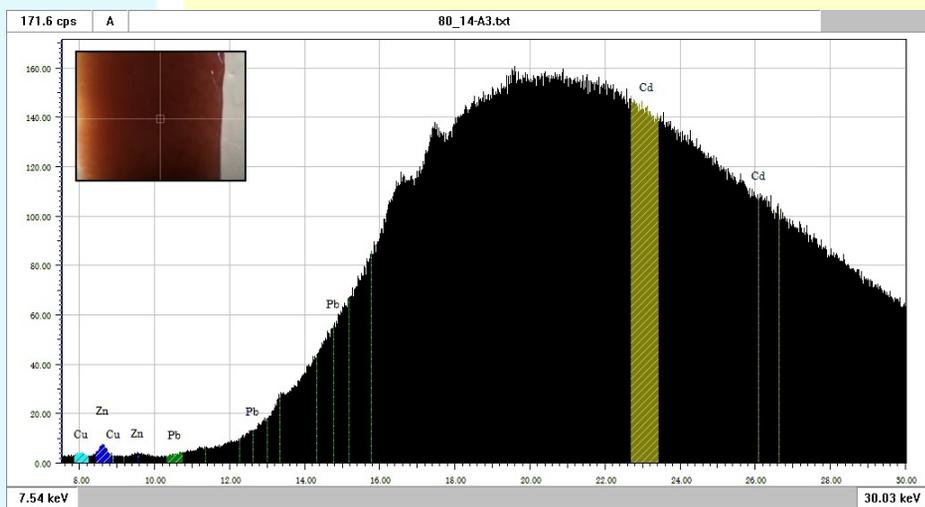


Figura 23: Espectro obtido para uma amostra de fígado aplicando energia de 50 keV

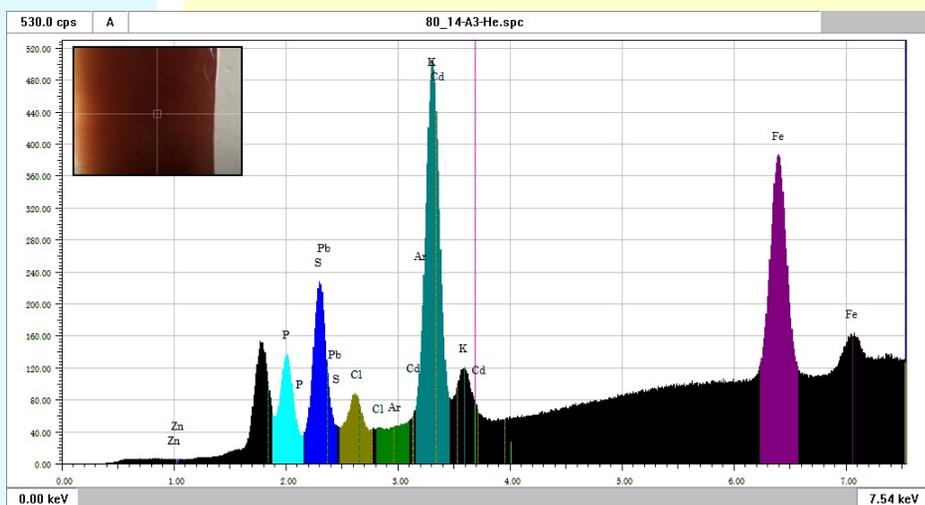


Figura 24: Espectro obtido para uma amostra de fígado aplicando energia de 15 keV

Existe uma zona contínua, representada a preto, que corresponde à radiação de fundo já mencionada. Cada pico representa uma transição electrónica correspondente a um dado elemento. Assim, cada elemento pode apresentar vários picos conforme as transições que podem ocorrer em consequência da lacuna inicial. Na Figura 23, observa-se a linha principal (transição mais provável) do chumbo identificada a verde e, ainda, linhas secundárias com energias superiores. Na Figura 24 observam-se também linhas de menor energia para o Pb. Neste caso particular, este elemento não está presente. Avaliando a Figura 24 verifica-se que o elemento Fe está presente nesta amostra, pois existe um pico característico da transição mais provável e também um pico de uma das transições menos prováveis. Para o tratamento dos resultados só se avaliou o pico principal de cada elemento analisado. No canto superior esquerdo de cada espectro está representada a zona da amostra em que incidiu os raios-X.

Para avaliar os resultados obtidos é necessário conhecer a área de cada pico a que foi retirada a radiação de fundo: conhecendo as gamas de energia correspondentes a cada elemento e, tomando o caso particular do ferro com energias entre 6,23 - 6,57 keV (Figura 25), subtraiu-se a área correspondente ao fundo.

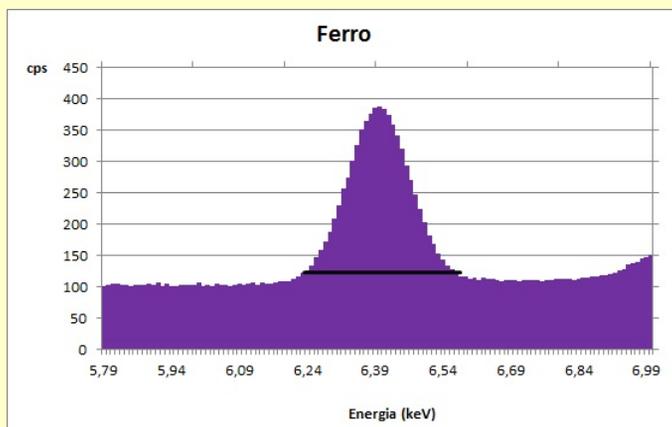


Figura 25: Pico representativo do ferro

O procedimento para retirar o fundo consistiu em primeiramente, verificar qual o valor de cps correspondente aos valores de energia 6,23 keV e 6,57 keV, que neste caso são, aproximadamente, iguais. Realizou-se uma média destes valores com o objectivo de encontrar um ponto médio da linha de base do pico de Fe (representada a preto na Figura 25). Seguidamente, a cada valor de cps que constituí o pico, subtraiu-se o valor médio da linha de base (Figura 26). Finalmente, somou-se cada valor de obtido com o objectivo de conhecer a área do pico característico do ferro.

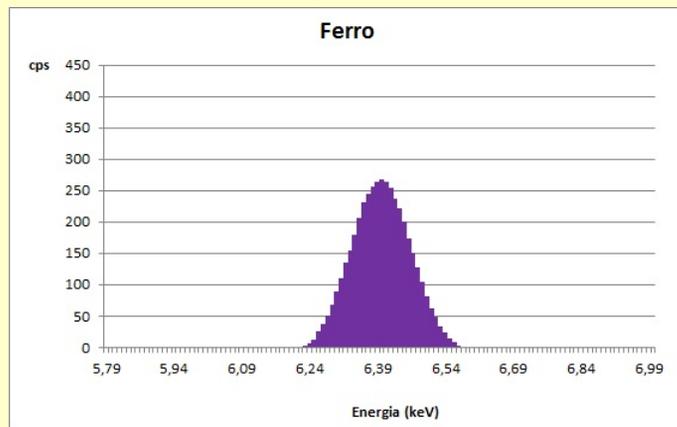


Figura 26: Pico representativo do ferro sem fundo

Observando a Figura 24 verifica-se que para os picos característicos de P, S e Cl existe uma sobreposição das curvas gaussianas. Assim, para obter a área de cada pico individual realizou-se o tratamento destes picos como sendo apenas um. Verificou-se qual o valor de cps para o valor inicial da gama de energia do P (1,88 keV) e o valor de cps para o valor final da gama de energia do Cl (2,77 keV). Calculou-se o declive da linha de base destes três picos, realizando a diferença entre estes dois valores e dividindo o resultado pelo número valores existentes entre os valores de energia 1,88 e 2,77 keV (Figura 27). Seguidamente, traçou-se a recta da linha de base desde o valor de cps para 1,88 keV até ao

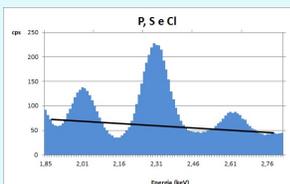


Figura 27: Picos característicos de P, S e Cl

valor de cps para 2,77 keV utilizando o declive calculado. Subtraiu-se o valor de cps obtido para a amostra com o obtido para a recta da linha de base extraíndo, assim, o fundo de cada valor individual. Finalmente, realizou-se a soma dos valores de cps obtidos para cada pico obtendo a área de interesse do P, S e Cl.

Estes tratamentos foram realizados para todos os espectros obtidos tendo em consideração as gamas de energia características de cada pico. O pico de ferro em particular pode ser observado tanto em resultados obtidos com raios-X de 15 keV e de 50 keV. A eficiência de fotoionização para a incidência de 15 keV é superior relativamente à de 50 keV e deu-se maior importância aos resultados obtidos.

Água destilada e Solução Contaminada

Primeiramente, analisaram-se as amostras de água destilada e da solução administrada às alfaces e aos animais dos grupos T3, T4 e T5 para verificar a presença dos elementos Zn, Pb e Cd (Figura 28).

T3, T4 e T5 - grupos de 5 animais do sexo feminino, sujeitos a administração de uma solução realizada de acordo com a secção *Cultivo de Lactuca sativa* durante 5, 10 e 15 dias, respectivamente

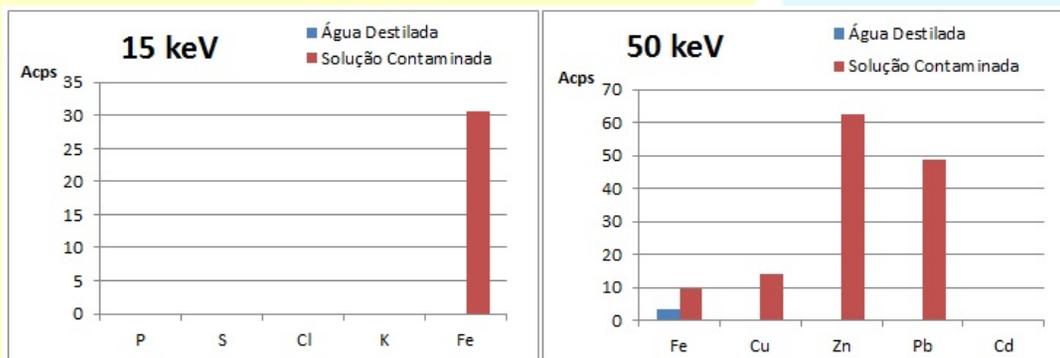


Figura 28: Áreas de cps obtidas para a água destilada e solução contaminada; À esquerda encontram-se os resultados obtidos para energia de incidência de 15 keV; À direita a energia de incidência foi de 50 keV

Avaliando os resultados obtidos para incidência de raios-X com

energia de 15 keV, observa-se a presença de Fe com uma área de cps de 30,69. Dentro das limitações e sensibilidade do equipamento e técnica de XRF, verifica-se a inexistência dos elementos P, S, Cl, K e Fe na amostra de água destilada. Para os 50 keV observa-se apenas a presença de Fe na amostra de água destilada (Área de cps de 3,35). Para a amostra de solução contaminada verifica-se a presença de ferro (área cps de 9,69), de cobre (área de 14,23) de zinco (área de cps de 62,59) e, por fim, chumbo com uma área de cps de (área de 48,53). A área do pico de Fe presente na amostra de solução de contaminantes é superior à área da amostra de água destilada.

Lactuca sativa

Uma avaliação inicial dos resultados sem qualquer tratamento da amostra de alface (Figuras 33 e 34 - *Anexo I*) e amostra de órgão (Figuras 23 e 24) permite reconhecer diferenças. Como é conhecido um órgão e um vegetal apresentam estruturas elementares distintas. Com este estudo pode avaliar-se algumas dessas diferenças: para os espectros correspondentes a 15 keV, mesmo tendo em conta a diferença de escala, para a alface observam-se valores de área de cps muito superiores relativamente ao órgão. A amostra de alface parece apresentar valores de área de cps muito inferiores para o P e S relativamente ao órgão. Pode mesmo verificar-se que não existe Fe na alface. São claramente visíveis níveis muito baixos de Cl e K no órgão relativamente à alface.

Realizou-se esta análise em três amostras de alface fresca e seca tanto de controlo como contaminada. Foi calculada a média e desvio padrão de cada grupo. É de referir que os elementos não presentes parecem ter uma tendência para não existir na amostra (P e S) ou são resultados pouco semelhantes apresentando um desvio padrão muito elevado relativamente aos outros elementos

referenciados (Cd).

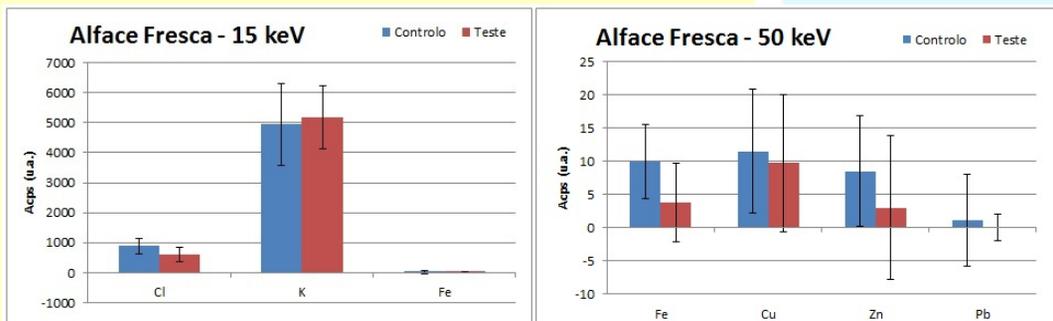


Figura 29: Valores médios de áreas de cps obtidas para amostras de alface fresca para os grupos controlo e teste; À esquerda encontram-se os resultados obtidos para energia de incidência de 15 keV; À direita a energia de incidência foi de 50 keV

Comparando primeiramente os grupos teste e controlo para amostra de alface fresca (Figura 29), pode verificar-se que existe uma tendência para a diminuição dos valores médios de Cl, Fe (incidência a 50 keV), Cu, Zn e Pb na amostras sujeitas à contaminação relativamente às amostras controlo. Para os elementos de número atómica mais elevado não se conseguiu obter homogeneidade das amostras. Pode observar-se uma tendência para um aumento nos valores médios de área de cps do K, embora tendo em consideração os valores de desvio padrão obtidos. Parece existir o elemento ferro (incidência a 15 keV) mas, relativamente aos elementos de Cl e K, os seus valores médios de área de cps são vestigiais.

Para a alface seca (Figura 30) tanto para os 15 keV como os 50 keV pode-se verificar que existe uma tendência para que os valores de desvio padrão sejam inferiores aos obtidos nas amostras anteriores. Parece existir apenas um decréscimo dos valores de área de cps para o elemento Cl. Os restantes elementos (excepto o Fe obtido a 15 keV) parecem apresentar um aumento significativo, embora os elementos Fe e Zn obtidos a 50 keV apresentem pouca homogeneidade na amostra. É de referir a presença de

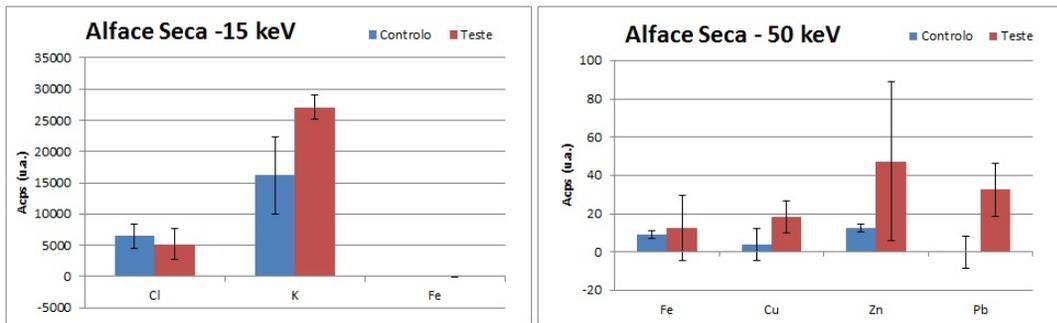


Figura 30: Valores médios de áreas de cps obtidas para amostras de alface seca para os grupos controlo e teste; À esquerda encontram-se os resultados obtidos para energia de incidência de 15 keV; À direita a energia de incidência foi de 50 keV

chumbo no grupo teste em comparação com o grupo controlo.

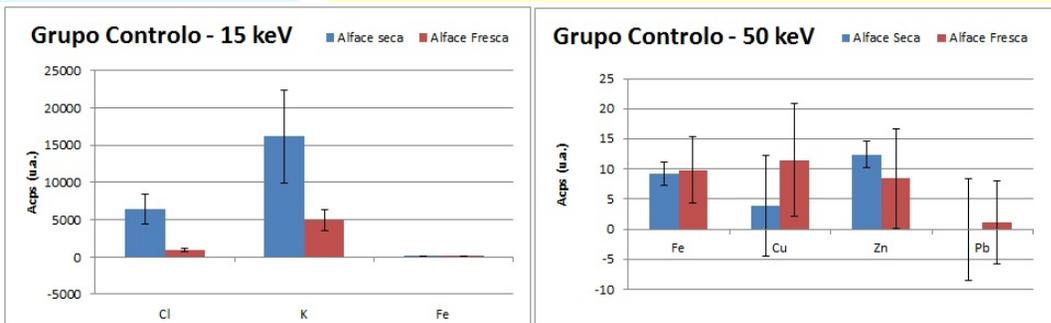


Figura 31: Valores médios de áreas de cps obtidas para o grupo controlo para amostras de alface fresca e seca; À esquerda encontram-se os resultados obtidos para energia de incidência de 15 keV; À direita a energia de incidência foi de 50 keV

Comparando a alface seca com a fresca do grupo controlo (Figura 31) pode observar-se, para energias de 15 keV parece ocorrer uma diminuição da média das áreas de cps tanto de Cl como de K. O Fe está presente embora em níveis muito reduzidos relativamente a estes elementos. Para energias de 50 keV apenas as amostras secas do Fe e Zn apresentam homogeneidade. Com isto, parecem existir valores médios de área de cps superiores para amostras frescas para o Fe e Cu. Para o Zn parece existir uma tendência para que os valores médios de área de cps diminuam com a secagem.

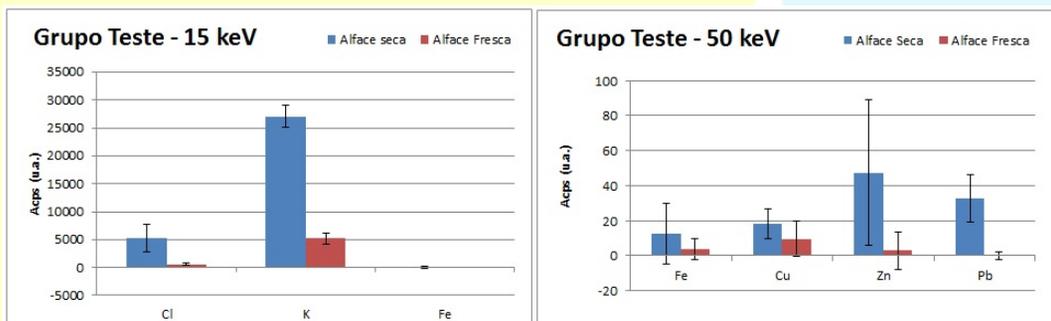


Figura 32: Valores médios de áreas de cps obtidas para o grupo teste para amostras de alface fresca e seca; À esquerda encontram-se os resultados obtidos para energia de incidência de 15 keV; À direita a energia de incidência foi de 50 keV

Para os grupo teste (Figura 32) parece existir a mesma correlação concluída anteriormente, que os valores médios de área de cps parecem aumentar quando nas amostras secas. É de referir que os valores de desvio padrão para o Fe, Cu e Zn (energias de 50 keV) sugerem pouca homogeneidade de amostras.

Mus musculus administrados com água contaminada

Após o tratamento de resultados já mencionado obtiveram-se os valores médios da área de cps e o desvio padrão de cada elemento para as amostras de fígado, rim (zona do córtex e da medula) e coração de cada grupo (C1, T3, T4, T5) - *Anexo II* (apenas estão apresentados os resultados para um órgão). Posteriormente estes resultados foram agrupados com o objectivo de comparar, elemento a elemento, cada grupo e cada órgão (*Anexo III* e *Anexo IV*, respectivamente).

Nas Figuras 43 e 44 (*Anexo III*) pode observar-se os resultados obtidos para amostras de fígado dos grupos C1, T3, T4 e T5. Na Figura 43, particularmente o grupo C1, verificou-se que o Fe, Cu, Zn, Pb e Cd, apresentam os valores médios de área de cps de 146,51; 23,73; 82,65; 1,53 e 0 com desvio padrão de 54,11; 5,63;

C1 - Grupo de 8 animais do sexo masculino que foram mantidos sem qualquer manipulação experimental;

T3 - Grupo de 5 animais do sexo feminino que foram sujeitos a administração de água contaminada com Cd, Pb e Zn durante 5 dias;

T4 - Grupo de 5 animais do sexo feminino que foram sujeitos a administração de água contaminada com Cd, Pb e Zn durante 10 dias;

T5 - Grupo de 5 animais do sexo feminino que foram sujeitos a administração de água contaminada com Cd, Pb e Zn durante 15 dias.

15,98; 8,67 e 155,48, respectivamente. Para o grupo T3, verificou-se que o Fe apresenta um valores médios de área de cps 19,80 com um desvio padrão de 40,53; para o Cu obtiveram-se valores médios de área de cps de 16,90 e um desvio padrão de 8,66; o Zn apresenta uma média de área de cps de 67,45 e um desvio padrão de 13,94; o Pb apresenta valores médios de área de cps de 0 com desvio padrão de 9,52; finalmente, para o Cd observam-se valores médios de área de cps de 16,47 e um desvio padrão de 53,04. Para o grupo T4, os elementos ferro, cobre, zinco, chumbo e cádmio apresentam os seguintes valores de média de área de cps: 196,80; 16,97; 64,59; 0 e 20,61 com os seguintes desvio padrão: 24,18; 6,45; 11,44; 3,61; 101,31, respectivamente. Por fim, para o grupo T5 o elemento de Fe apresenta uma área média de cps de 238,77 com um desvio padrão de 30,95; para o Cu obteve-se um valor médio de área de cps de 20,53 e um desvio padrão de 5,49; o elemento Zn apresenta um valor de área de cps de 62,66 com um desvio padrão de 6,33; Ambos os elementos de Pb e Cd apresentam uma área média de 0 com um desvio padrão de 10,84 e 117,43, respectivamente. Avaliando estes resultados pode referir-se que o ferro tem tendência para aumentar e o zinco tem tendência a diminuir com o aumento do tempo de exposição à contaminação, embora se observem valores de desvio padrão elevados relativamente à média. Nenhuma conclusão significativa pode ser retirada para os elementos de Pb e Cd devido aos valores obtidos para o desvio padrão. Relativamente ao cobre é de referir que o grupo C1 apresenta valores superiores comparativamente aos outros grupos e ainda que parece existir tendência para aumentar com o tempo de exposição (de T3 a T5). Avaliando os resultados obtidos para energia de incidência de 15 keV (Figura 44) pode verificar-se que os valores de desvio padrão, em geral, são elevados relativamente à sua média. Para o elemento ferro parece existir, também, uma tendência para o seu aumento com o tempo

de exposição, embora o grupo T4 exiba valores médios de área de cps inferiores aos do grupo T3. Avaliando os elementos P, S, Cl e K não parece existir uma correlação significativa entre cada grupo. Para o fósforo verifica-se valores de média de área de cps muito semelhantes para os diferentes grupos. Parece existir uma tendência para se manter constante ao longo do tempo de exposição. O elemento S parece ter a mesma tendência que o P, embora o valor de média de área de cps para o grupo T3 seja ligeiramente superior. Para o cloro parece existir uma tendência para diminuir ao longo do tempo de exposição, mas como se pode verificar, para o grupo T5, os valores médios de área de cps são superiores. O potássio não apresenta uma correlação significativa. Os valores de desvio padrão obtidos para cada grupo são elevados relativamente à média obtida.

Para o rim na zona do córtex (Figuras 45 e 46 - *Anexo III*), para incidência de energia de 50 keV, pode verificar-se que parece existir uma tendência para o aumento do elemento Fe com o aumento do tempo de exposição tal como se verificou no fígado com a mesma incidência de energia. Para o elemento Zn parece existir uma tendência para o aumento do valor médio de cps tendo em conta apenas os grupos teste T3, T4 e T5. Para o Cu nada de significativo se pode concluir mas verifica-se que os grupos C1 e T4 apresentam valores médios de área de cps superiores aos grupos T3 e T5. Para os elementos Pb e Cd, nada se pode concluir devido aos valores elevados de desvio padrão. Para incidências de energia inferiores (Figura 46) pode referir-se que relativamente ao P parece existir uma tendência para a sua diminuição desde o momento que ocorre a administração com 5 dias para a administração de 15 dias. Parece ocorrer um decréscimo do elemento S à medida que o tempo de exposição aumenta, já para o Cl parece ocorrer o comportamento contrário embora com valores médios de área cps inferiores. Para o potássio (K) verifica-se que o grupo C1 tem valo-

res médios inferiores aos obtidos para o grupo T3 e à medida que o tempo de exposição aumenta parece existir uma diminuição da média da área de cps. Nada se pode referir relativamente à correlação entre grupos para o elemento Fe. É de referir que os valores de desvio padrão obtidos são elevados relativamente à sua média.

Na Figura 47 (*Anexo III*), pode verificar-se que para o rim na zona da medula, os elementos Pb e Cd não apresentam resultados significativos devido ao facto de se ter obtido diferenças significativas entre os animais presentes em cada grupo. Para os restantes elementos não parece existir uma correlação significativa. Para o Fe verifica-se variações alternadas das áreas médias de cps, embora o valor mais elevado seja do grupo T5. Para o Cu, o valor de média de área de cps mais elevado é também o do grupo T5, embora pareça que existe um decréscimo do mesmo do grupo controlo até ao grupo exposto a água contaminada durante 10 dias. O Zn exhibe um comportamento semelhante ao do Cu embora com valores médios de área de cps superiores. Os valores de desvio padrão obtidos são elevados relativamente à sua média. Avaliando a Figura 48, pode referir-se que, para os elementos K e Fe, não parece existir uma correlação significativa pois existe uma variação alternada do valor médio de área de cps com o aumento do tempo de exposição. Para o Cl parece existir um aumento da média da área de cps ao longo do tempo de exposição de 5, 10 e 15 dias, mas grupo controlo apresenta valores superiores de área de cps relativamente ao grupo T03. Parece existir uma tendência para que o elemento de S se mantenha constante ao longo do tempo de exposição. Já o P apresenta valores de área de cps que aparentam diminuir ao longo do tempo de exposição, embora o valor média de área de cps para o grupo controlo revele-se inferior ao obtido para o grupo T3. É importante referir que os valores de desvio padrão obtidos revelam variações elevadas dos valores que constituem cada grupo.

Finalmente, para o órgão coração (Figuras 49 e 50 - *Anexo II*) verifica-se que parece não existir qualquer correlação significativa entre cada grupo. Para elementos obtidos a 50 keV, particularmente o Fe, verifica-se que o valor médio de área de cps para o grupo T4 é muito superior aos restantes, mas este apresenta valores de desvio padrão muito elevados relativamente aos desvios padrão obtidos para os restantes grupos. Assim, é de referir que parece existir uma tendência para o aumento do elemento Fe ao longo do tempo. Para o elemento Cu parece que ocorreu um aumento da média da área de cps do grupo C1 para o grupo T3. Posteriormente, parece que existe uma diminuição deste elemento ao longo do tempo de exposição. Para o Zn é de referir que não parecem existir correlações significativas entre grupos. Como se pode verificar, tanto para o elemento Cd como para o Pb não é possível retirar qualquer conclusão. Na Figura 50 pode verificar-se que tanto o Fe como o K e o S parecem apresentar o mesmo tipo de variação ao longo do tempo de exposição. Parece existir uma diminuição do grupo controlo para o grupo T3; posteriormente ocorre um aumento para o grupo T4 e, por fim novamente um decréscimo para o grupo T5. Para o cloro parece que existe uma tendência para se manter constante ao longo do tempo de exposição, embora o grupo T4 apresente valores de média de área de cps superiores aos dos restantes grupos. Comportamentos semelhantes aparentam verificar-se para o elemento P embora pareça existir um aumento nos valores médios de área de cps dos grupos C1 e T5. Os valores de desvio padrão obtidos para cada grupo são elevados.

No *Anexo IV* pode verificar-se os mesmos resultados obtidos para os grupos C1, T3, T4 e T5 mas comparando os elementos presentes em cada órgão. Na Figura 51 pode verificar-se que todos os elementos, excepto o Cd e Pb, parecem existir com um valor superior de média de área de cps no fígado relativamente aos

restantes órgãos. Comparando as estruturas histológicas do rim, pode verificar-se que tanto o elemento Fe como o Zn parecem ter tendência para revelar valores de média de área de cps superiores na zona da medula. Para os elementos de chumbo e cádmio não se pode retirar uma conclusão significativa devido aos valores elevados de desvio padrão. Na Figura 52 verifica-se que existe uma tendência para elementos como o Fe e K existirem com valores superiores de área de cps no fígado relativamente a outros órgãos. No caso dos elementos P, S e Cl os valores médios de área de cps superiores tem tendência a verificar-se na zona da medula no rim. Comparando as estruturas histológicas do rim verifica-se que existe uma tendência para que o valor médio das áreas de cps seja maior na zona da medula em todos os elementos. Para o P e Cl o coração parece apresentar as médias de área de cps mais baixas.

Para o grupo T3 (Figuras 53 e 54 - *Anexo III*), para energia de incidência de 50 keV, verifica-se que o fígado tem tendência a apresentar valores médios de área de cps relativamente a outros órgãos para os elementos de Fe e Zn. O elemento de Cu parece existir com valores superiores de média de área de cps no coração relativamente aos outros órgãos. Verifica-se a diferença entre as estruturas histológicas do rim, sendo que mais uma vez a zona da medula parece apresentar valores médios de área de cps superiores aos da zona do córtex. Para os elementos de Cd e Pb, devido aos seus valores de desvio padrão, nada se pode concluir. Para energia de incidência de 15 keV, pode verificar-se que as correlações obtidas são semelhantes às obtidas para o grupo C1. Verifica-se para o Fe e K os valores médios de área de cps têm tendência a ser superiores no fígado, enquanto que para os elementos P, S e Cl os valores médios de área de cps têm tendência a ser mais elevados na zona da medula do rim. Em todos os elementos parece verificar-se que a estrutura da medula no rim apresenta valores médios de área de cps superiores à zona do córtex

no mesmo órgão. Alguns valores de desvio padrão apresentam-se elevados.

Para o grupo exposto a água contaminada durante 10 dias (T4), verificaram-se resultados semelhantes aos obtidos para os dois grupos anteriores (Figuras 55 e 56 - *Anexo IV*). Para energia de incidência de raios-X de 50 keV verifica-se valores médios de área de cps superiores no fígado para os elementos ferro e zinco. Já para o elemento Cu verifica-se valores superiores no coração. Apenas se verificou valores superiores de média de área de cps na zona da medula comparativamente à zona do córtex do rim para os elementos Fe e Zn. Para os elementos de chumbo e cádmio nada se concluiu. Na Figura 56 avalia-se que para os elementos de P, S e Cl parecem existir valores superiores de média de área de cps na zona da medula do rim relativamente aos outros órgãos estudados. Já para os elementos Fe e K verifica-se que é o fígado tem tendência a apresentar valores médios de área de cps superiores relativamente aos restantes órgãos. Parece constante que os valores médios de área de cps da zona da medula do rim se apresentem superiores aos da zona do córtex. É de notar que os valores de desvio padrão são relativamente elevados.

Nas Figuras 57 e 58 (*Anexo IV*) estão representados os resultados finais para o grupo T05 comparando cada órgão estudado. Primeiramente, para os elementos obtidos com incidência de 15 keV, verifica-se que se obtêm as mesmas correlações obtidas para os resultados do grupo T4. Já para os elementos obtidos com incidência de 50 keV, refere-se também que para o elemento Cu parecem existir valores médios de área de cps superiores na zona da medula do rim. Verifica-se que apenas para o elemento de ferro parece obter-se valores médios de área de cps superiores aos restantes órgãos. Para o Zn, esta avaliação parece ser inconclusiva devido à proximidade dos valores médios de área de cps entre o fígado e a zona da medula do rim, tendo em consideração

C1 - Grupo de 8 animais do sexo masculino que foram mantidos sem qualquer manipulação experimental;

C2 - Grupo de 5 animais do sexo feminino que foram sujeitos a administração de ração modificada controle durante 5 dias;

C3 - Grupo de 5 animais do sexo feminino que foram sujeitos a administração de ração modificada controle durante 10 dias;

T1 - Grupo de 5 animais do sexo masculino que foram sujeitos a administração de ração modificada teste durante 5 dias;

T2 - Grupo de 2 animais do sexo masculino e 3 animais do sexo feminino que foram sujeitos a administração de ração modificada teste durante 10 dias.

os seus valores de desvio padrão. Para todos os elementos parecem ocorrer valores médios de área de cps superiores na zona da medula relativamente à zona do córtex do rim. Para os elementos de Cd e Pb nada se pode concluir pois exibem valores de desvio padrão muito relevados relativamente aos seus valores médios.

Mus musculus administrados com alface controle e alface contaminada

Realizou-se um tratamento de resultados semelhante ao referido anteriormente. Os grupos avaliados são C1, C2, C3, T1 e T2 comparando-se os mesmos parâmetros, cada órgão (*Anexo V*) e cada grupo (*Anexo VI*).

Nas Figuras 59 e 60 pode observar-se os resultados obtidos para o fígado comparando cada grupo. Para energia de incidência de 50 keV pode referir-se que o elemento Cu parece ter tendência a manter-se constante ao longo do estudo. Para o Fe verifica-se que o grupo C1 parece apresentar valores médios de área de cps mais baixos relativamente aos restantes grupos. Parece existir uma tendência para que os valores médios de área de cps permaneçam constantes nos grupos de controle positivo (C2 e C3). Existe uma tendência também para a diminuição dos valores médios de área de cps ao longo do tempo de exposição a contaminantes (T1 e T2). Parece existir uma tendência para que o elemento Zn diminua à medida que o tempo de exposição a ração modificada controle aumente. Avaliando os grupos T1 e T2 verifica-se que parece ocorrer um aumento dos valores médios de área cps relativamente ao grupo C3. O grupo T2 parece apresentar valores médios de área de cps inferiores relativamente ao grupo T1, sugerindo que o elemento zinco apresenta uma tendência para diminuir à medida que aumenta o tempo de exposição. Relativamente aos elementos de Pb e Cd nada se pode concluir pois apresentam desvios padrão

elevados. Os valores de desvio padrão para os elementos de Fe, Cu e Zn, são altos relativamente à sua média. Na Figura 60 pode observar-se que o P, S e Cl parece terem uma tendência a permanecerem constantes ao longo do estudo, embora se possa referir que parece ocorrer um ligeiro aumento dos valores médios de área de cps do elemento P e S à medida que o tempo de exposição à ração modificada teste aumenta (T1 e T2). Para o elemento de Fe parece existir uma tendência para o aumento da média da área de cps para os grupos controlo (C1, C2 e C3) e um decréscimo da média da área de cps para os grupos sujeitos a ração modificada teste. Para o K parece ocorrer uma diminuição dos valores médios de área de cps ao longo dos grupo controlo e um aumento dos valores médios de área de cps ao longo dos grupos teste.

Para o rim na zona do córtex avaliou-se primeiramente a Figura 61. Para o elemento ferro pode observar-se que existe uma tendência para que os valores médios da área de cps se mantenha constante para os grupos C2 e C3, embora sejam superiores ao valor médio de área de cps obtido para o grupo C1. É possível referir ainda que parece existir uma tendência para que ocorra uma diminuição dos valores médios da área de cps ao longo do período de exposição à ração modificada teste (T1 e T2). Para o elemento cobre parece existir uma tendência para que os valores médios de área de cps de cada grupo se mantenham constantes, embora se possa referir que o grupo C2 parece apresentar valores médios de área de cps ligeiramente superiores. Para o Zn verifica-se que existe uma tendência para a diminuição da média da área de cps para os grupos controlo positivo e que os grupos teste parecem apresentar-se constantes ao longo do período de exposição. Pouco se pode concluir dos elementos Cd e Pb pois apresentam valores de desvio padrão elevados. Os restantes elementos apresentam também desvios padrão elevados embora inferiores aos de chumbo e cádmio. Para incidência de raios-X de 15 keV para a

zona do córtex do rim (Figura 62) pode verificar-se que o elemento P tem tendência apresentar valores de média de área de cps progressivamente mais baixos relativamente ao grupo C1. Para os grupos teste pode referir-se que parece que apresentam uma tendência para se manterem constantes ao longo do tempo de exposição. Para o enxofre pode observar-se que existe uma tendência para que o valor médio da área de cps do grupo C1 seja superior ao dos grupos C2 e C3, que parece manterem-se constantes ao longo do tempo de exposição a ração modificada controlo. Para os grupos teste parece que existe uma tendência para que os valores médios da área de cps do S aumente ao longo do tempo de exposição. Avaliando o elemento cloro pode referir-se que parece não existirem correlação significativas, embora pareça ocorrer um aumento do valor médio da área de cps do grupo controlo negativo para os grupos controlo positivos. Parece que existe uma tendência para que os valores de média de área de cps dos grupos C2, C3 e T1 se mantenham constantes e que ocorra uma diminuição para o grupo T2, sugerindo uma diminuição ao longo do tempo de exposição. Para o elemento potássio parece que não ocorrem correlações significativas, embora se possa referir que parece que exista um aumento dos valores médios da área de cps do grupo T1 para o grupo T2 e uma diminuição dos valores médios da área de cps do grupo C2 para o grupo C3. Parece que existe uma tendência para que os valores médios de área de cps para o ferro se mantenham relativamente constantes, embora se verifique uma tendência para a diminuição desses valores no grupo T2.

Nas Figuras 63 e 64 pode verificar-se os resultados para a zona da medula do rim. Na primeira, para incidência de 50 keV pode referir-se que, para o Cd e Pb nada se pode concluir, pois obtiveram-se valores de desvio padrão elevados. Para o Zn pode observar-se que parece existir uma tendência para que os valores médios dos grupos C1, C2 e C3 diminuam ao longo do estudo. Para os grupos

teste pode referir-se que parece ocorrer um aumento dos valores médios de área de cps relativamente aos dos grupos controlo (negativo e positivo) e que parece existir uma diminuição ao longo do tempo de exposição. Para o Cu pode referir-se que existe uma tendência para que os valores médios de área de cps se mantenham constantes ao longo deste estudo. Para o elemento ferro pode-se classificar como semelhantes as suas correlações com as obtidas para o Zn embora a correlação dos grupos controlo (negativo e positivo) seja inversa, aumente ao longo do tempo de estudo. Na Figura 64 pode referir-se que o ferro parece exibir as mesmas correlações interpretadas anteriormente. Para os elementos P, S e Cl observa-se que parece que os valores médios de área de cps se mantêm constantes. Para o elemento P parece ocorrer uma diminuição ligeira dos valores médios de área de cps do grupo C3 relativamente aos restantes grupos. Para o elemento S parece ocorrer um aumento dos valores médios de área de cps do grupo T2. Para o Cl parece existir um decréscimo nos valores médios da área de cps dos grupos C1 e T2. Para o potássio pode referir-se que as correlações obtidas são as mesmas para as obtidas para a zona do córtex do rim, embora na zona da medula pareça existir uma diminuição dos valores médios de área de cps do grupo T1 para o grupo T2 em vez de um aumento.

Na Figura 65 apresenta-se os resultados finais para o coração com incidência de raios-X de 50 keV. Para Fe, Cu e Zn parece existir o mesmo tipo de correlação entre os grupos controlo negativo e positivo. Parece ocorrer um aumento dos valores médios de cps do grupo C1 para o grupo C2 e, posteriormente ocorre uma diminuição destes valores do grupo C2 para o grupo C3, sugerindo uma diminuição ao longo do tempo de estudo. Para os grupos teste (T1 e T2) parece ocorrer um decréscimo dos valores médios de área de cps nos elementos Fe e Cu do grupo T1 para o grupo T2. Para o Zn, estes valores médios de área de cps parecem per-

manecer constantes ao longo do tempo de exposição. Nada se pode concluir em relação aos elementos de cádmio e chumbo pois apresentam valores de desvio padrão elevados. Na Figura 66, os elementos fósforo e cloro parece que apresentam o mesmo tipo de correlação. Ambos os valores médios de área de cps dos grupos C1 e C2 para estes elementos parecem manter-se constantes, tal como para os grupos T1 e T2. Valores médios de área de cps inferiores a estes parecem ser apresentados para o grupo C3. Para os elementos potássio e ferro pode referir-se que também apresentam o mesmo tipo de correlação entre grupos, pois ambos apresentam valores médios de área de cps constantes para os grupos T1 e T2. Parecem apresentar também uma aumento dos valores médios de área de cps do grupo C1 para o grupo C2. Pode referir-se ainda que os valores médios de área de cps mais baixos parecem pertencer ao grupo C3. Relativamente ao enxofre parece que ocorre uma diminuição dos valores médios de área de cps ao longo do tempo de administração de ração modificada controlo. Posteriormente, parece que existe um aumento dos valores médios de área de cps à medida que aumenta o tempo de exposição à ração modificada teste. É de referir que os valores de desvio padrão de todos os elementos são muito elevados relativamente à sua média.

No Anexo V pode verificar-se os mesmos resultados obtidos para os grupos C2, C3, T1 e T2 mas comparando os elementos presentes em cada órgão. A avaliação referente ao grupo C1 está mencionada em *Mus musculus administrados com alface controlo e alface contaminada*. Na Figura 67 pode referir-se que parece existir uma tendência para que os elementos Fe e Zn apresentem valores médios de área de cps mais elevados no fígado. Pode referir-se ainda, para estes dois elementos, que parece que apresentam valores médios de área de cps superiores na zona da medula do rim relativamente à zona do córtex. Para o elemento Cu

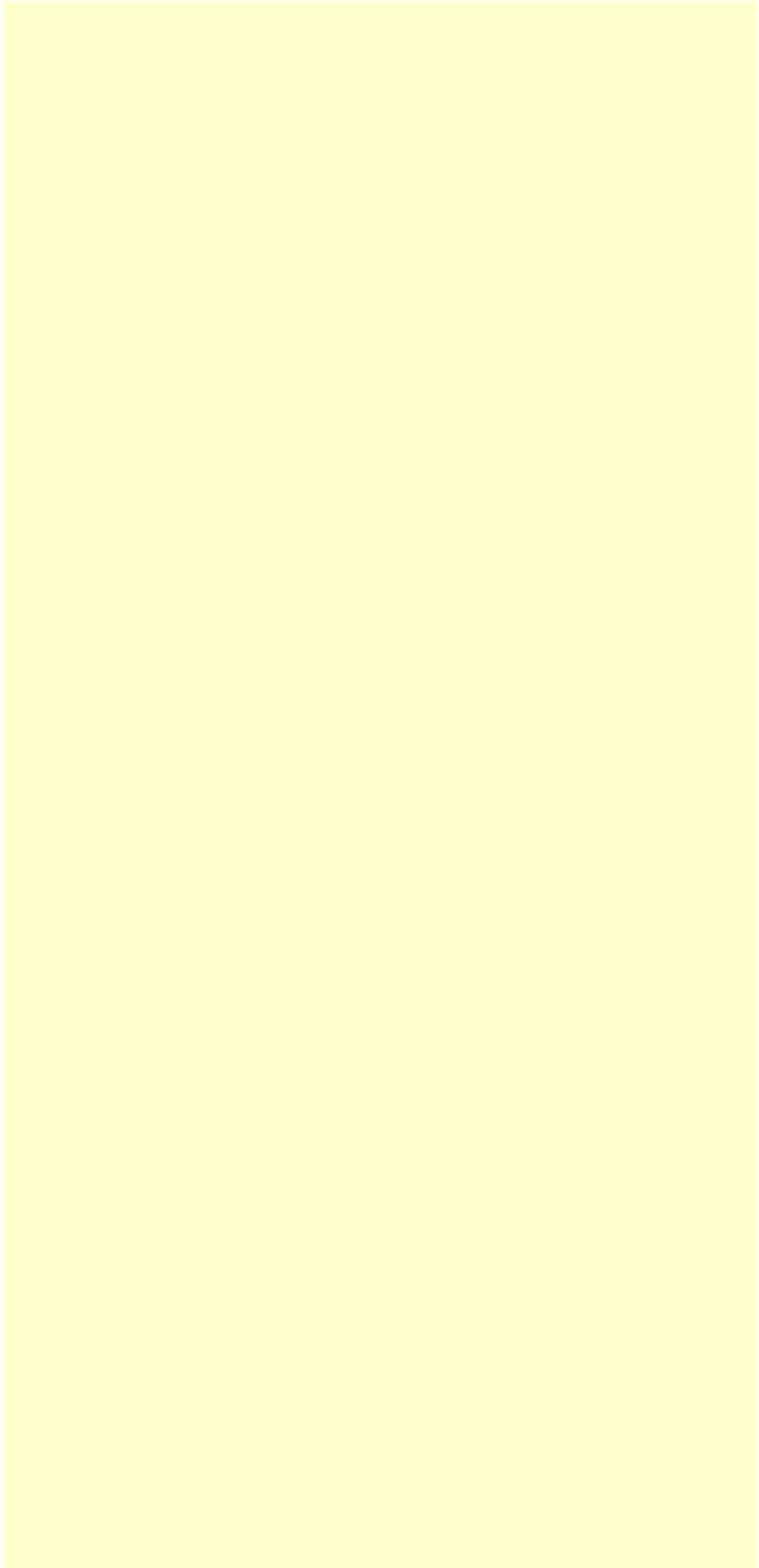
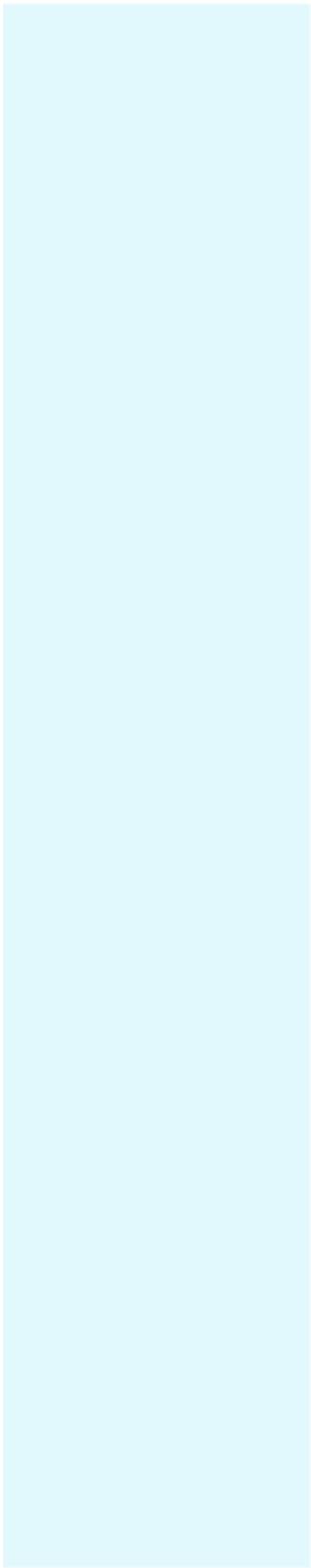
é possível observar que parece que os valores médios de área de cps mais elevados pertencem ao coração e à zona do córtex do rim pois são muito próximos. Para o cádmio e chumbo nada se pode concluir pois os seus desvios padrão são elevados. Na Figura 68 pode referir-se que para o elemento ferro parece existir uma tendência para que o valor médio de área de cps mais elevado esteja presente no fígado. Para os restantes elementos parece que existe uma tendência para que os valores médios de área de cps mais elevados pertençam à zona da medula do rim. Comparando as duas estruturas do rim pode referir-se que, em todos os elementos, parece existir valores médios de área de cps superiores para a zona da medula. Para o cloro verifica-se que o valor médio de área de cps mais baixo parece pertencer ao coração. Os valores de desvio padrão apresentados são muito elevados.

Nas Figuras 69 e 70 estão representados os resultados finais para o grupo C3. Para incidência de raios-X de 50 keV verifica-se que parece existir uma correlação entre órgãos semelhante ao grupo anterior. Tanto para o Fe como para o Zn, o fígado é o órgão que aparenta apresentar valores médios de área de cps mais elevados em relação aos restantes órgãos. Para estes dois elementos pode referir-se também que existe uma tendência que os valores médios de cps para a zona de medula do rim sejam superiores aos apresentados para a zona do córtex do rim. Para o Cu verifica-se que parece existir uma relação constante entre os valores médios de área de cps dos diferentes órgãos estudados. Para os elementos Cd e Pb nada se pode concluir pois os seus desvios padrão são elevados. Na Figura 70 pode referir-se que para o Fe e K parece existir uma tendência para que o valor médio de área de cps mais elevado seja no fígado. Para o P, S e Cl parece que existe uma tendência para que os valores médios de área de cps mais elevados pertençam à zona da medula do rim. Em todos os elementos, pode referir-se que parece existir uma tendência para que valores

médios de área de cps sejam superiores para a zona da medula do rim. Para o cloro verifica-se que o valor médio de área de cps mais baixo parece pertencer ao coração. Os valores de desvio padrão de todos os elementos são muito elevados relativamente à sua média.

Na Figura 71 verifica-se que parece existir uma correlação entre órgãos semelhante aos grupos anteriores. Para o ferro e zinco, pode observar-se que existe uma tendência para que os valores médios de área de cps sejam mais elevados no fígado em relação aos restantes órgão. Pode referir-se ainda, para estes dois elementos, que parece que apresentam valores médios de área de cps superiores na zona da medula do rim relativamente à zona do córtex. Para o elemento Cu pode observar-se que parece não existir qualquer variação entre os valores médios de área de cps de fígado, rim na zona do córtex, rim na zona da medula e coração. Para os elementos Cd e Pb nada se pode concluir pois os seus desvios padrão são elevados. Na Figura 72 pode referir-se que para o ferro o seu valor médio de área de cps mais elevado relativamente aos restantes parece estar presente no fígado. Para o elemento potássio verificar-se que parece existir uma semelhança entre os dois valores médios de área de cps mais elevados que estão presentes na zona da medula do rim e no fígado. Os elementos de P, S e Cl parecem estar presentes na zona da medula do rim com valores médios de área de cps mais elevados relativamente aos outros órgãos. Tanto no elemento Cl como P parece existir uma semelhança entre o fígado e a zona do córtex do rim apresentando valores médios de área de cps semelhantes entre eles. Para todos os elementos pode referir-se que parece existir uma diferença entre os valores médios de área de cps da zona da medula e da zona do córtex do rim, sugerindo que nesta se apresentem sempre valores inferiores. Os valores de desvio padrão obtidos são relativamente elevados.

Para o grupo T2, administrado com ração modificada teste durante 10 dias, pode observar-se na Figura 73 que parece existir a presença de ferro no fígado, apresentando valores médios de área de cps superiores relativamente aos restantes órgãos. Para o Zn pode referir-se que os valores médios de área de cps parece mais elevados na zona da medula do rim e no fígado. Para o elemento Cu parece existir uma semelhança entre órgãos. Para o Cd e Pb nada se pode verificar pois os seus valores de desvio padrão são muito elevados relativamente às médias respectivas. Para o Fe, Cu e Zn pode referir-se que parece que os valores médio de área de cps para a zona da medula do rim são sempre mais elevados que para a a zona do córtex do rim. Já para a Figura 74, no geral pode referir-se que as correlações parecem ser semelhantes às obtidas no grupo T1. Os valores médios de área de cps de Fe e K parecem ter uma tendência para serem superiores no fígado. Já o Cl, S e P parecem estar presentes, com valores médios de áreas de cps superiores, na zona da medula no rim. Parece existir a mesma correlação encontrada em todos os resultados finais quando se compara grupos de estudo, os valores médios de área de cps são superiores na zona da medula relativamente à zona do córtex do rim, para o P, S, Cl, K e Fe. Para o elemento Cu, parece existir ainda uma tendência para apresentar valores médios de área de cps baixos no coração relativamente aos outros órgãos.



Conclusão

O principal objectivo deste estudo foi interligar a avaliação elemental com a avaliação morfológica. Pretendeu-se entender que consequências os metais pesados, como Cd, Zn e Pb, originam no organismo se entrarem na cadeia alimentar através de alimentos e água.

Ao nível da avaliação morfológica das alfases pode concluir-se que não existem alterações morfológicas significativas no grupo controlo nem teste. Avaliou-se morfológicamente cada órgão de murganho. Pode referir-se que para o pulmão não se observaram diferenças significativas entre os grupos C2 e C3. No grupo T1 e T2 observaram-se imagens de estase e em cerca de metade dos casos é evidente a presença de BAL. Apenas para o grupo T5 é que se observaram imagens sugestivas de estase. Já para o rim, nos grupos C2 e C3 observou-se a presença de estase, que parece ser mais evidente no grupo C3. Nos grupos T1 e T2 observou-se áreas extensas de estase. Os grupos administrados com água contaminada apresentam áreas extensas de estase e em alguns casos a retracção do tufo glomerular relativamente ao grupo controlo. No fígado, os grupos administrados com ração modificada controlo apresentam vaculização acentuada variada. Nos grupos administrados com ração modificada teste existe um caso com necrose e dois casos com infiltrado inflamatório focal. Nos grupos T3, T4 e T5, verificou-se vaculização acentuada no grupo T3 e a

presença de alguma estase nos grupos restantes. No coração, os grupos C2 e C3 apresentaram pequenos focos com alterações degenerativas do citoplasma. Estas alterações morfológicas são semelhantes para os grupos T1 e T2. Para os grupos administrados com água contaminada verificaram-se pequenos focos com alterações degenerativas do citoplasma, parecendo evoluir ao longo do tempo de exposição.

Para a avaliação elemental realizaram-se duas técnicas: GFAAS e XRF. O GFAAS foi utilizado para a quantificação dos elementos em estudo enquanto que o XRF permitiu a avaliação de vários elementos, mesmo não os quantificando. Embora estas duas técnicas tenham sido utilizadas com objectivos diferentes, a técnica de XRF é mais rápida, no sentido em que avalia vários elementos numa determinação com duração de, aproximadamente, 1,5 min, enquanto que a técnica de GFAAS realiza uma leitura em 3 min e só quantifica um elemento por leitura. O GFAAS necessita de um tratamento de amostra eficaz e eficiente, enquanto que a técnica de XRF não precisa de tratamento de amostra o que permite a utilização da mesma para outras avaliações (técnica não-destrutiva). Os custos associados à utilização da técnica de XRF são mais baixos comparativamente à técnica de GFAAS, principalmente pela utilização do gás inerte árgon. Mas como já foi referido, é necessário perceber que tipo de estudo se pretende para decidir qual a técnica a utilizar.

Os métodos aplicados para a determinação de Cd em amostras de alface e de órgão de murganho foram validados, embora se tenham obtido valores de % de interferência (selectividade) e de % de interceptação de y (gama de trabalho) fora do âmbito dos critérios de aceitação. Tendo em conta os valores adquiridos para os parâmetros de linearidade, precisão e exactidão, considerou-se que os métodos são válidos. A validação de métodos para a determinação de chumbo não foi concluído por motivos de ordem técnica e

problemas de contaminação. Sendo assim, não se quantificou Pb nas amostras em questão. Para o elemento Zn não se procedeu nem à validação de métodos nem à sua quantificação por motivos de ordem técnica.

Para as amostras de alface fresca contaminada, réplica 1, 2 e 3, obteve-se 0,529 ppm, 0,520 ppm e 2,735 ppm de cádmio, com desvios padrão relativos de 8 %, 11 % e 3 %, respectivamente. Estas concentrações são superiores ao limite permitido por lei (0,2 ppm) [25]. A diferença das réplicas 1 e 2 para a réplica três é significativa e pode dever-se à altura do ano em que se realizou a plantação das alfaces. As réplicas 1 e 2 foram cultivadas de Outubro a inícios de Dezembro, enquanto que a réplica 3 foi plantada de fins de Fevereiro a Março. Estas três réplicas foram utilizadas para preparar a ração modificada teste. Sabendo que 14 % (m/m) da réplica 1, 25 % (m/m) da réplica 2 e 61 % (m/m) da réplica 3 constituíam esta ração e apenas se utilizou 50 % de alface fresca, calculou-se o seu valor de concentração de cádmio: 0,937 ppm. Para as amostras de alface seca controlo e amostras de órgão de murganhos dos grupo C1, C2, C3, T1 e T2 obtiveram-se concentrações abaixo do LD. Conclui-se que a exposição a alface contaminada durante o máximo de 10 dias não permite uma acumulação de Cd nos órgãos de murganho estudados. A determinação de Cd nas amostras de órgãos de murganho dos grupos T3, T4 e T5 não foram realizadas por motivos de ordem técnica.

A avaliação elemental por análise de XRF permitiu não só avaliar a existência de Zn, Pb e Cd na solução com contaminantes, amostras de alface fresca e seca e órgão de murganho mas também a correlação existente entre grupos e órgãos estudados. Concluiu-se que existia Zn e Pb na solução contaminada, pois obteve-se um aumento do valor da área de cps relativamente à água destilada. Esta, não apresenta Zn nem Pb. Pode-se concluir ainda que as duas amostras não apresentam Cd. A inexistência de um dado

elemento é sempre definida pelas limitações e sensibilidade deste equipamento (para efeitos de facilidade de leitura esta conclusão só será mencionada aqui).

Com a técnica de XRF foi possível diferenciar as estruturas morfológicas da alface e órgão avaliando a sua assinatura elemental. As principais diferenças incluem a inexistência de Fe e níveis mais baixos de P e S na amostra de alface relativamente ao órgão. Os valores de Cl e K são extremamente elevados aquando da comparação da alface com o órgão. Comparando o grupo controlo e grupo teste de alface seca, conclui-se principalmente que existe a presença de Pb no grupo teste. É de referir que no grupo controlo não existe a presença de chumbo. Para o elemento Zn, concluiu-se que existe um aumento significativo do grupo controlo para o grupo teste, embora este não apresente homogeneidade de amostras. O elemento Cd parece não existir tanto num grupo como noutro. Os grupos controlo e teste de alface fresca foram avaliados e tendo em conta os seus valores de desvio padrão, principalmente para os elementos mais pesados, nada se concluiu. Comparando alface fresca e seca de cada grupo verificou-se que, no geral, parece existir um aumento do nível de todos os elementos aquando da secagem da alface, embora não exista homogeneidade de amostras (como já foi mencionado).

Pode-se concluir que parece não existir Cd nem Pb em todas as amostras de órgão de murganho analisadas, pois os resultados obtidos não apresentam homogeneidade. É de referir que sendo o Zn um metal essencial está sempre presente em todas as amostras de órgão. Comparando os grupos C1, T3, T4 e T5 pode-se referir que, no fígado, ocorre uma diminuição do nível de zinco ao longo do tempo de exposição. Esta conclusão está de acordo com a literatura [42], que refere que concentrações elevadas de zinco na dieta diminuem a sua absorção por parte do organismo. Parece existir um aumento do Fe ao longo do tempo de exposição. Para

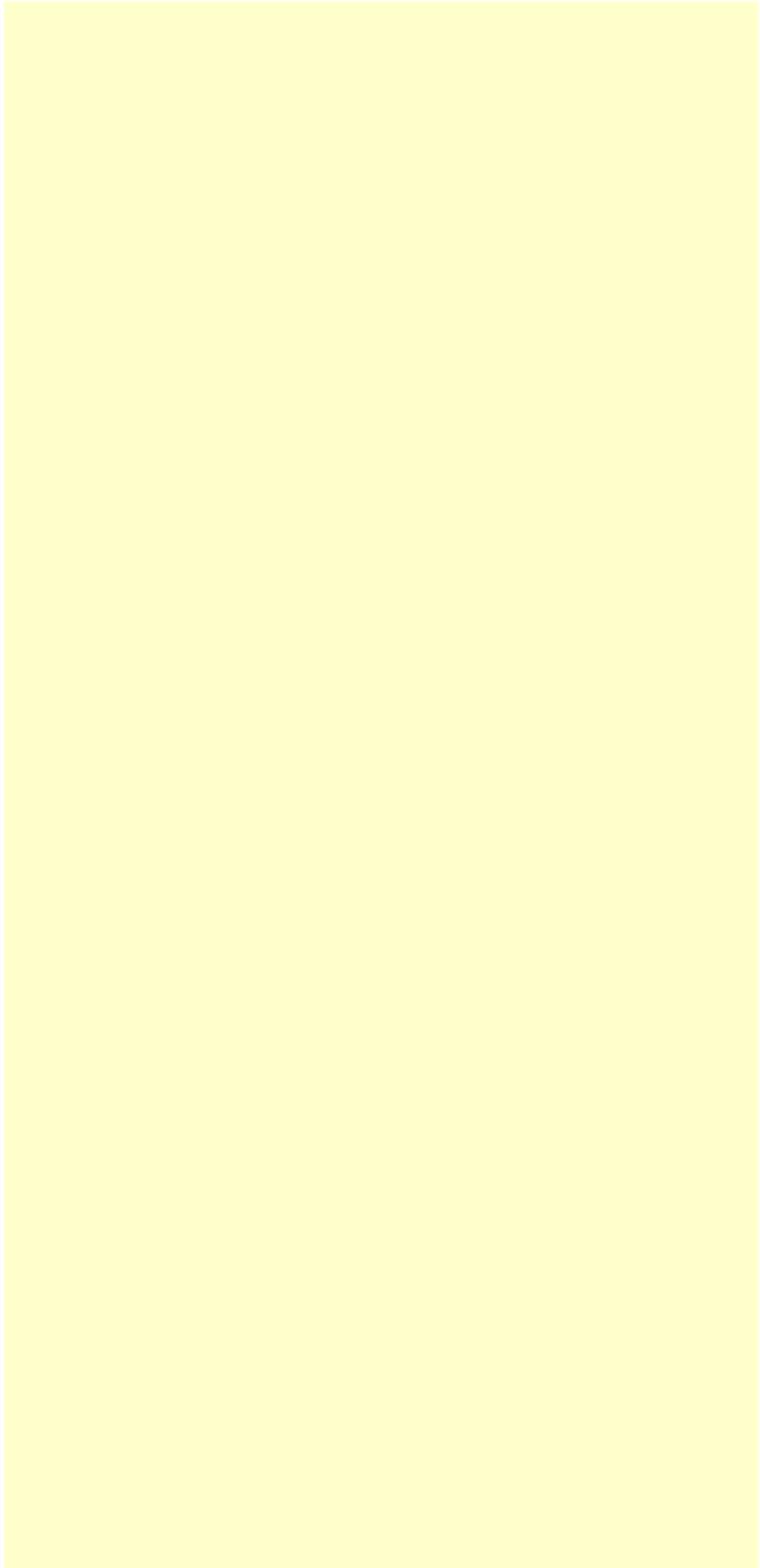
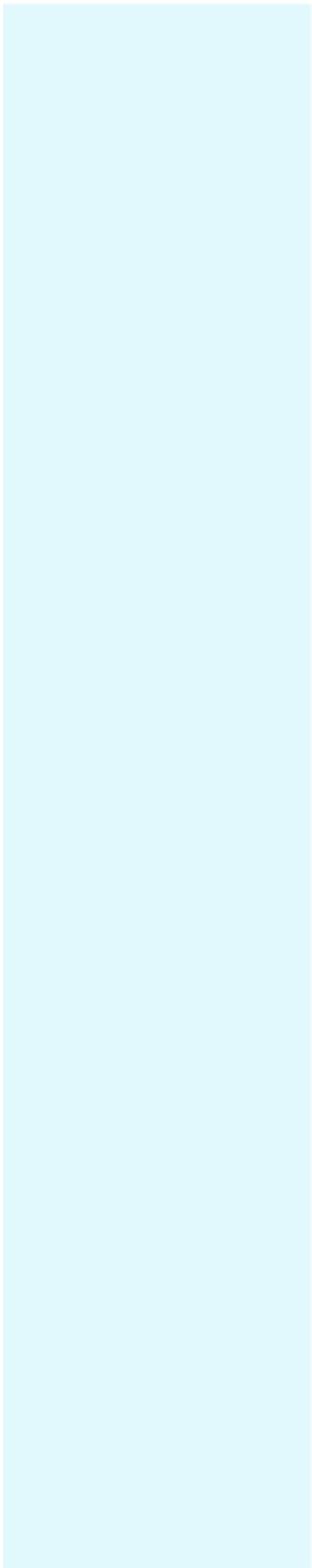
a zona do córtex do rim parece existir também um aumento do Fe. Na zona da medula do rim, o elemento Zn parece diminuir ao longo do tempo de exposição, embora pareça existir um ligeiro aumento no grupo T5. Para o coração não se concluiu nada de significativo. Para os grupos C1, C2, C3, T1 e T2, pode referir-se que no fígado existe uma diminuição de zinco ao longo dos grupos controlo. Dos grupos controlo para os testes parece existir um aumento deste metal; posteriormente ocorre uma diminuição ao longo do tempo de exposição. Para o elemento Fe ocorre um aumento nos grupos C2 e C3 e uma diminuição ao longo dos grupos teste. O K aumenta nos dois grupos, o que sugere que o seu nível aumenta com o aumento de exposição tanto a alface controlo como teste. Para a zona do córtex do rim, parece que nada de significativo se pode concluir para o elemento Fe. O Zn parece manter-se constante ao longo do tempo de exposição a alface contaminada e diminuir ao longo do tempo de exposição a alface controlo. O elemento K diminui ao longo dos grupos controlo positivos (C2 e C3) e aumenta nos grupos teste (T1 e T2). Na zona da medula do rim existe uma diminuição de zinco nos grupos controlo e também no grupos teste, embora os valores médios de área de cps do grupo C3 sejam inferiores aos do grupo T1. Para o Fe existe um aumento ao longo do tempo de exposição a alface controlo e uma diminuição ao longo tempo aquando da exposição a alface contaminada. O K diminuí ao longo dos grupos de controlo positivo e parece diminuir ligeiramente ao longo dos grupos teste. No coração verifica-se a mesma variação de Zn obtida para a zona do córtex do rim. O Fe diminui ao longo do tempo de exposição a alface controlo e também ao longo da exposição a alface contaminada, embora os valores médios de área de cps do grupo C3 sejam inferiores aos do grupo T1. Comparando os órgãos de murganho de cada grupo (C1, C2, C3, T1, T2, T3, T4 e T5) pode-se concluir que o Fe, Zn e K parecem existir em níveis mais elevados no fígado, na maioria

dos grupos. Já para a zona da medula do rim parece existir uma tendência para existir níveis elevados de P, S e Cl relativamente aos outros órgãos. Pode-se concluir também que, no rim, a zona da medula parece apresentar uma tendência para ter níveis mais elevados de todos os elementos relativamente à zona do córtex. Isto pode dever-se ao facto do processo de concentração da urina que ocorre na zona da medula.

As principais conclusões deste projecto são a detecção de Pb em alface seca por XRF e quantificação de Cd em alface fresca por GFAAS, embora nada se possa verificar ao nível da avaliação morfológica. É de referir que para os murganhos que foram sujeitos a uma solução com Cd, Pb e Zn durante 5, 10 e 15 dias parece existir Zn acumulado no fígado e na zona da medula do rim. Já para os murganhos sujeitos a alface controlo durante 5 e 10 dias pode concluir-se que parece existir uma acumulação de Zn em todos os órgãos estudados. Para os murganhos sujeitos a alface contaminada durante 5 e 10 dias pode referir-se que parece existir uma acumulação de Zn no fígado e na zona da medula do rim. É de referir que nos órgãos de murganhos que foram sujeitos a alface controlo e contaminada não se obteve qualquer resultado significativo para os elementos de Cd (GFAAS e XRF) e Pb (XRF) de acordo com a sensibilidade e limitações das técnicas utilizadas. É interessante referir que, no geral, parecem existir consequências ao nível morfológico embora nada se possa referir quando à presença de Cd e Pb nos órgãos. Parecem existir alterações morfológicas com a mudança da dieta embora, em alguns casos, a presença de contaminantes pareça fazer evoluir gravemente essas alterações.

Para estudos futuros, sugere-se a utilização de tempos de exposição maiores tanto ao nível da água como da alimentação, o estudo individual para cada metal com o objectivo de compreender melhor as consequências associadas a cada um deles e, ainda a avaliação de outros alimentos e bebidas como possíveis trans-

portadores de contaminantes. Sugere-se, para este projecto em particular, a continuação do processo de quantificação tanto para o Pb como para o Zn.



Bibliografia

- [1] J. Santos, M. Oliva-Teles, C. Delerue-Matos, and M. Oliveira, "Multi-elemental analysis of ready-to-eat "baby leaf" vegetables using microwave digestion and high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry," *Food chemistry*, vol. 151, pp. 311–316, 2014.
- [2] Instituto Nacional de Estatística, "Balança Alimentar Portuguesa 2008-2012," Abril 2014.
- [3] Agência Portuguesa do Ambiente, I.P. e Ministério da Agricultura, do Mar, do Ambiente e do Ornamento do Território, "Programa Nacional para o Uso Eficiente da Água - Implementação 2012-2020," Junho 2014.
- [4] Instituto Nacional de Estatística. http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&ind0corrCod=0007254&contexto=bd&selTab=tab2. (Pesquisa realizada a Junho de 2014).
- [5] Bi, Xiangyang and Feng, Xinbin and Yang, Yuangen and Li, Xiangdong and Shin, Grace PY and Li, Feili and Qiu, Guangle and Li, Guanghui and Liu, Taoze and Fu, Zhiyou, "Allocation and source attribution of lead and cadmium in maize (*Zea mays* L.) impacted by smelting emissions," *Environmental Pollution*, vol. 157, no. 3, pp. 834–839, 2009.

- [6] M. Intawongse and J. R. Dean, "Uptake of heavy metals by vegetable plants grown on contaminated soil and their bioavailability in the human gastrointestinal tract," *Food additives and contaminants*, vol. 23, no. 1, pp. 36–48, 2006.
- [7] S. Demirel, M. Tuzen, S. Saracoglu, and M. Soylak, "Evaluation of various digestion procedures for trace element contents of some food materials," *Journal of hazardous materials*, vol. 152, no. 3, pp. 1020–1026, 2008.
- [8] K. Bakkali, N. R. Martos, B. Souhail, and E. Ballesteros, "Characterization of trace metals in vegetables by graphite furnace atomic absorption spectrometry after closed vessel microwave digestion," *Food Chemistry*, vol. 116, no. 2, pp. 590–594, 2009.
- [9] Y. Yang, F. Li, X. Bi, L. Sun, T. Liu, Z. Jin, and C. Liu, "Lead, zinc, and cadmium in vegetable/crops in a zinc smelting region and its potential human toxicity," *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, vol. 87, no. 5, pp. 586–590, 2011.
- [10] Gabinete de Estatística da União Europeia. <http://epp.eurostat.ec.europa.eu/portal/page/portal/environment/data/database>. (Pesquisa realizada a Junho de 2014).
- [11] R. Chang, *Chemistry*. Mc Graw Hill, 10th ed., 2010.
- [12] R. A. Goyer, "Toxic and essential metal interactions," *Annual review of nutrition*, vol. 17, no. 1, pp. 37–50, 1997.
- [13] J. Harte, C. Holdren, R. Schneider, and C. Shirley, *Toxics A to Z: A guide to everyday pollution hazards*. Univ of California Press, 1991.
- [14] O. D. Uluozlu, M. Tuzen, D. Mendil, and M. Soylak, "Assessment of trace element contents of chicken products from tur-

- key," *Journal of hazardous materials*, vol. 163, no. 2, pp. 982–987, 2009.
- [15] C. R. Nwokocha, D. U. Owu, M. I. Nwokocha, C. S. Ufearo, and M. O. Iwuala, "Comparative study on the efficacy of *Allium sativum* (garlic) in reducing some heavy metal accumulation in liver of wistar rats," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 50, no. 2, pp. 222–226, 2012.
- [16] World Health Organization (WHO), *Zinc in Drinking-Water, Guidelines for drinking-water quality*. 2nd ed., 2003.
- [17] P. Parsons and G. Dixon, *The periodic table: A field guide to the elements*. Quercus Publishing Inc., 2014.
- [18] F. Z. K. UKBAY and E. Kuyumcu, "Determination of trace element contents of *Thymus* species from Turkey," *Turk J Chem*, vol. 34, pp. 911–919, 2010.
- [19] Z. Kayaalti, G. Mergen, and T. Söylemezoğlu, "Effect of metallothionein core promoter region polymorphism on cadmium, zinc and copper levels in autopsy kidney tissues from a turkish population," *Toxicology and applied pharmacology*, vol. 245, no. 2, pp. 252–255, 2010.
- [20] World Health Organization (WHO), "Exposure to Cadmium: A Major Public Concern," 2010.
- [21] World Health Organization (WHO), *Cadmium in Drinking-Water, Guidelines for drinking-water quality*. 2011.
- [22] L. C. A. Melo, L. R. F. Alleoni, F. A. Swartjes, and E. B. da Silva, "Cadmium uptake by lettuce (*Lactuca sativa* L.) as basis for derivation of risk limits in soils," *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, vol. 18, no. 4, pp. 888–901, 2012.

- [23] E. H. Jihen, M. Imed, H. Fatima, and K. Abdelhamid, "Protective effects of selenium (se) and zinc (zn) on cadmium (cd) toxicity in the liver and kidney of the rat: histology and cd accumulation," *Food and chemical toxicology*, vol. 46, no. 11, pp. 3522–3527, 2008.
- [24] *Decreto-Lei nº 306/2007 de 27 de Agosto do Diário da República, 1ª série, nº 164; Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional.*
- [25] *Regulamento nº 1881/2006 da Comissão Europeia de 19 de Dezembro de 2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios; Jornal Oficial da União Europeia.*
- [26] World Health Organization (WHO), "Exposure to Lead: A Major Public Concern," 2010.
- [27] AEMITEQ - Associação para a Inovação Tecnológica e Qualidade, *Espectrofotometria de Absorção Atómica*. 1996.
- [28] R. D. Braun, *Introduction to Instrumental Analysis*. McGraw-Hill International Editions, 1987.
- [29] L. S. Birks, *X-Ray Spectrochemical Analysis*, vol. XI. U.S Naval Research Laboratory, Washington D. C.: Interscience Publishers, 1959.
- [30] A. S. P. de Sousa Moreno, *Non-destructive Characterization of Artworks in Paper Support Using Spectroscopic Techniques*. PhD thesis, Departamento de Física, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 2013.
- [31] G. L. Clark, *Physical Methods in Chemical Analysis*, vol. III. New York: Academic Press Inc. Publishers, 1956. (pág. 383-399).

- [32] K. S. Subramanian, "Determination of metals in biofluids and tissues: sample preparation methods for atomic spectroscopic techniques," *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, vol. 51, no. 3, pp. 291–319, 1996.
- [33] M. de Lurdes Gonçalves, *Métodos Instrumentais para Análise de Soluções. Análise Quantitativa*. Fundação Calouste Gulbenkian, 2^a ed.
- [34] G. Relacre 13 *Validação de métodos internos de ensaio em análise química*, 2000.
- [35] K. Lambie and S. Hill, "Microwave digestion procedures for environmental matrices. critical review," *Analyst*, vol. 123, no. 7, pp. 103R–133R, 1998.
- [36] F. E. Smith and E. A. Arsenault, "Microwave-assisted sample preparation in analytical chemistry," *Talanta*, vol. 43, no. 8, pp. 1207–1268, 1996.
- [37] Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. <http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/AreasCientificas/AlimentNutricao/AplicacoesOnline/TabelaAlimentos/PesquisaOnline/Paginas/DetailAlimento.aspx?ID=IS584>. (Pesquisa realizada em Julho de 2014).
- [38] F. Mor and S. Ceylan, "Cadmium and lead contamination in vegetables collected from industrial, traffic and rural areas in bursa province, turkey," *Food Additives and Contaminants*, vol. 25, no. 5, pp. 611–615, 2008.
- [39] J. D. Bancroft and A. Stevens, *Theory and Partical of Histological techniques*. Churchill Livingstone, 4^a ed.
- [40] S. E. Ruzin, *Plant Microtechnique and Microscopy*. Oxford University Press, USA.

[41] *Decreto-Lei nº 113/2013 de 7 de Agosto do Diário da República, 1ª série, nº 151; Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional.*

[42] World Health Organization (WHO), "WHO Food Additives," Series 17.

Anexos

Anexo I - Resultados brutos para uma amostra de alface seca contaminada com Cd, Pb e Zn

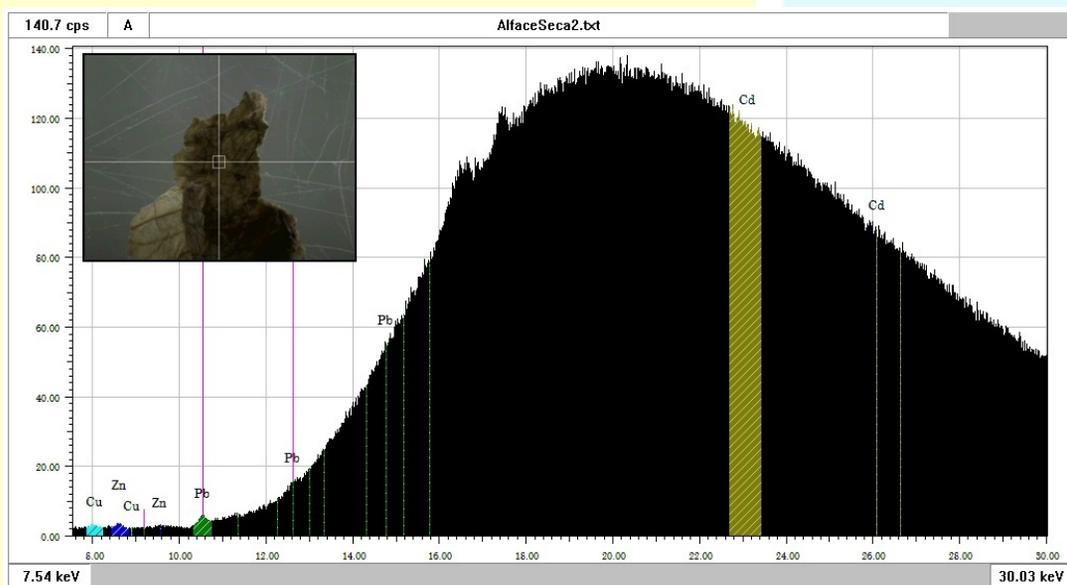


Figura 33: Incidência de raios-X com energia de 50 keV

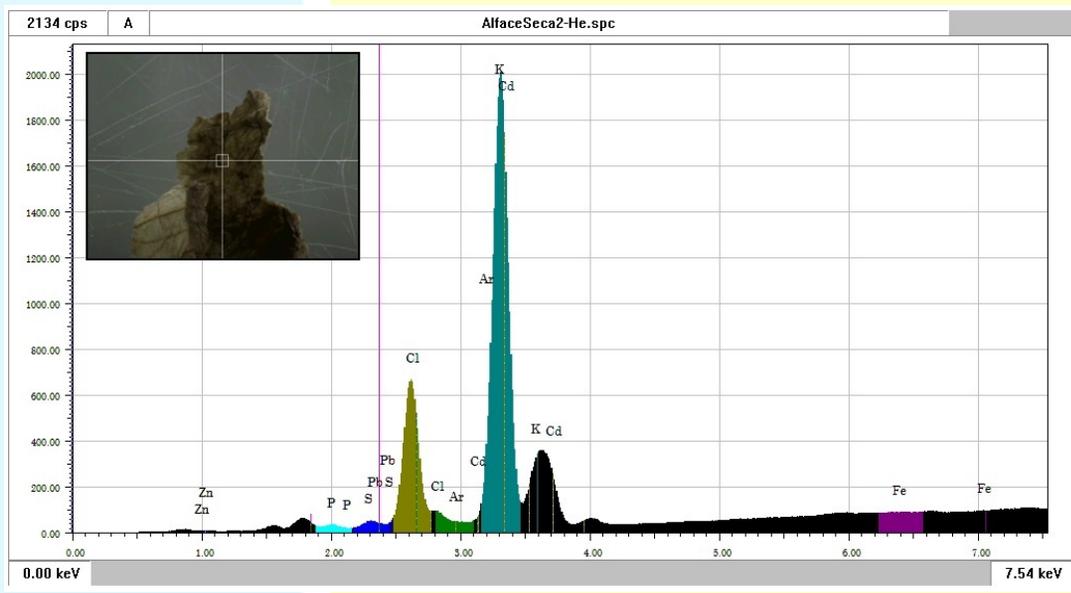


Figura 34: Incidência de raios-X com energia de 15 keV

Anexo II - Resultados obtidos para amostras de fígado dos grupos C1, T3, T4 e T5

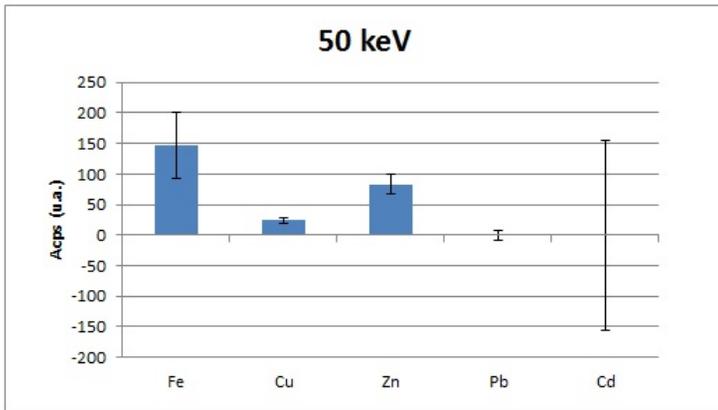


Figura 35: Incidência de raios-X com energia de 50 keV para o grupo C01

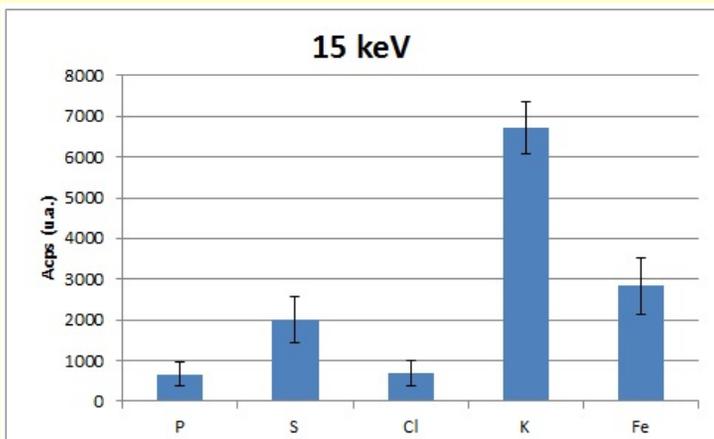


Figura 36: Incidência de raios-X com energia de 15 keV para o grupo C01

C1 - Grupo de 8 animais do sexo masculino que foram mantidos sem qualquer manipulação experimental;

T3 - Grupo de 5 animais do sexo feminino que foram sujeitos a administração de água contaminada com Cd, Pb e Zn durante 5 dias;

T4 - Grupo de 5 animais do sexo feminino que foram sujeitos a administração de água contaminada com Cd, Pb e Zn durante 10 dias;

T5 - Grupo de 5 animais do sexo feminino que foram sujeitos a administração de água contaminada com Cd, Pb e Zn durante 15 dias.

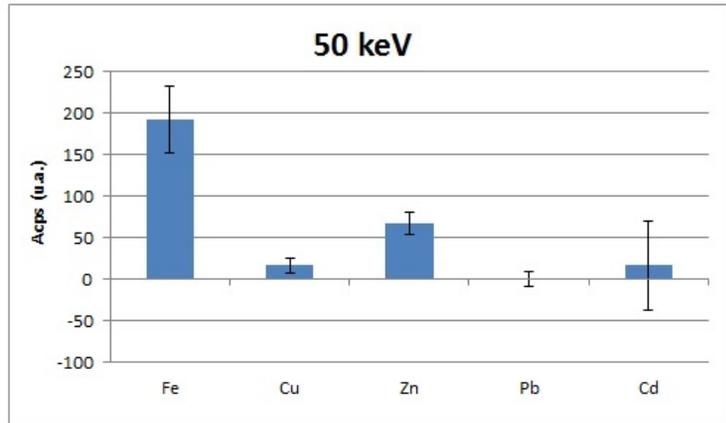


Figura 37: Incidência de raios-X com energia de 50 keV para o grupo T03

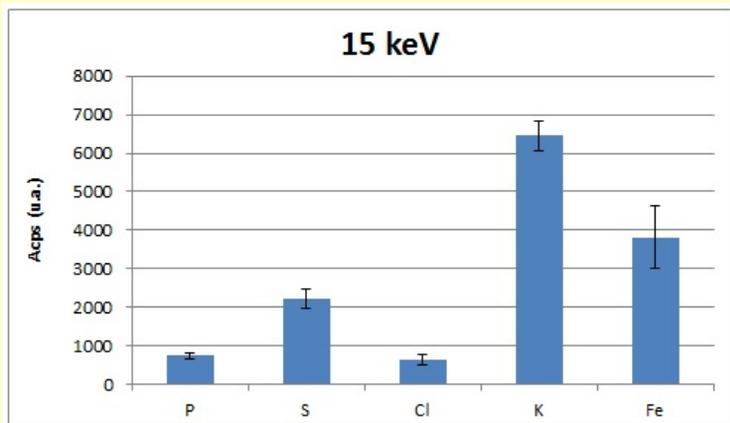


Figura 38: Incidência de raios-X com energia de 15 keV para o grupo T03

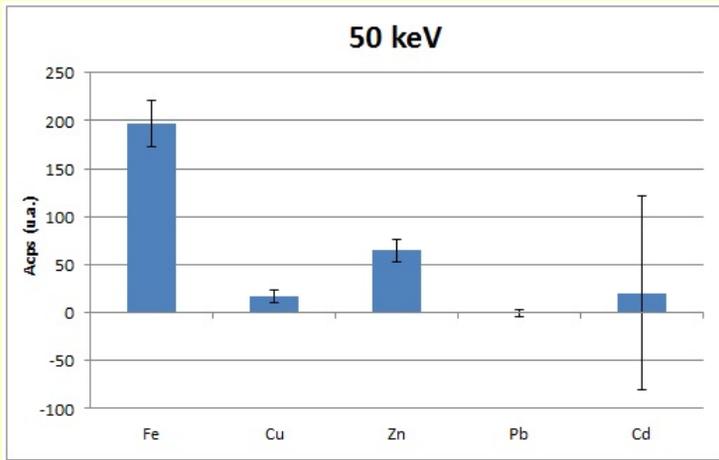


Figura 39: Incidência de raios-X com energia de 50 keV para o grupo T04

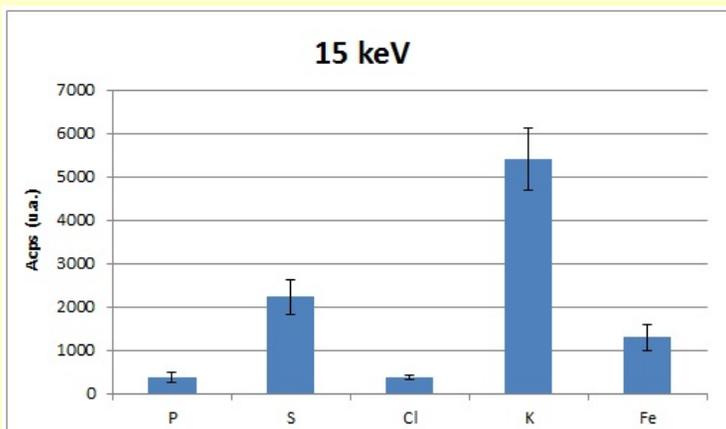


Figura 40: Incidência de raios-X com energia de 15 keV para o grupo T04

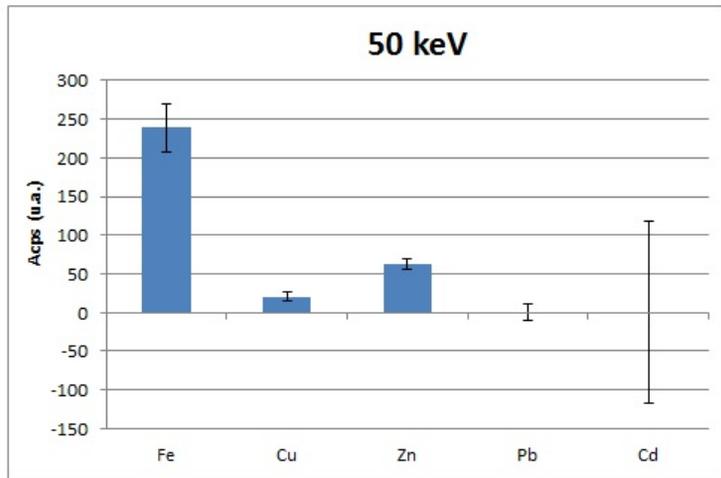


Figura 41: Incidência de raios-X com energia de 50 keV para o grupo T05

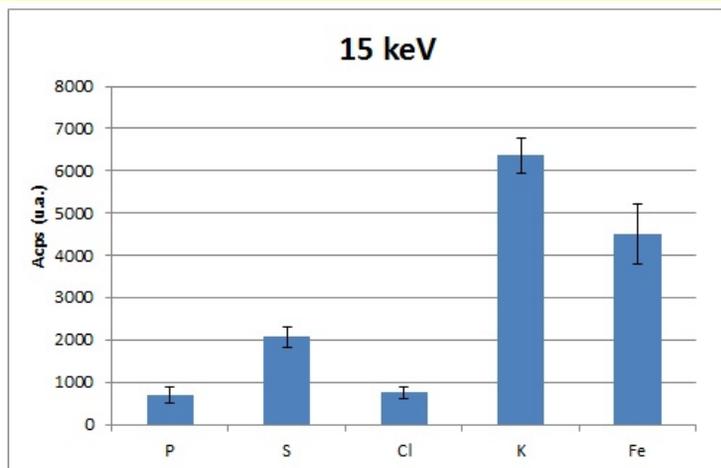


Figura 42: Incidência de raios-X com energia de 15 keV para o grupo T05

Anexo III - Resultados finais obtidos para amostras de fígado, rim na zona do córtex, rim na zona da medula e coração comparando os grupos C1, T3, T4 e T5.

C1 - Grupo de 8 animais do sexo masculino que foram mantidos sem qualquer manipulação experimental;

T3 - Grupo de 5 animais do sexo feminino que foram sujeitos a administração de água contaminada com Cd, Pb e Zn durante 5 dias;

T4 - Grupo de 5 animais do sexo feminino que foram sujeitos a administração de água contaminada com Cd, Pb e Zn durante 10 dias;

T5 - Grupo de 5 animais do sexo feminino que foram sujeitos a administração de água contaminada com Cd, Pb e Zn durante 15 dias.

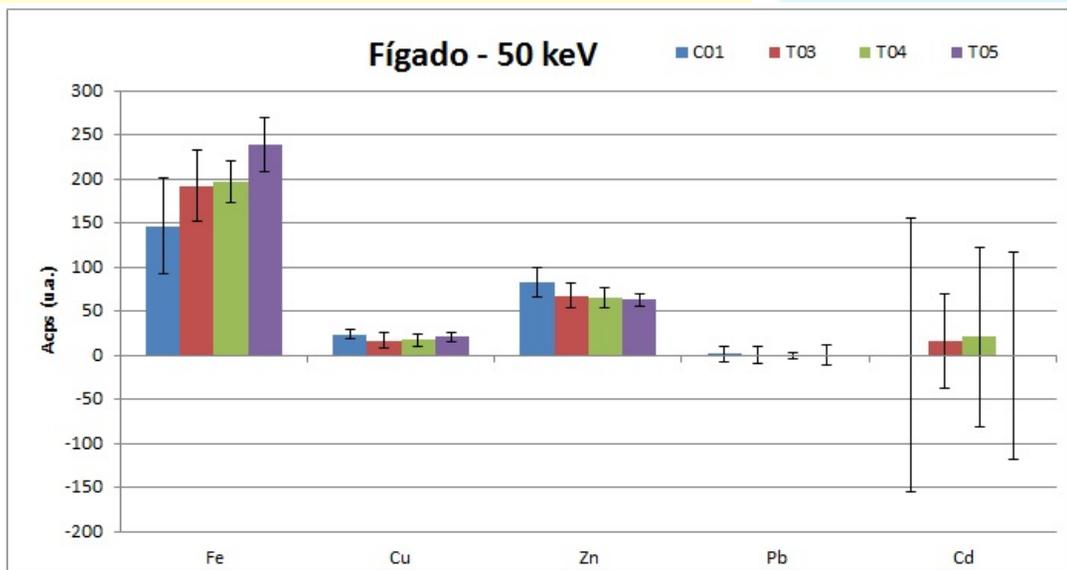


Figura 43: Resultados obtidos para amostras de fígado irradiadas com radiação raios-X com energia de 50 keV

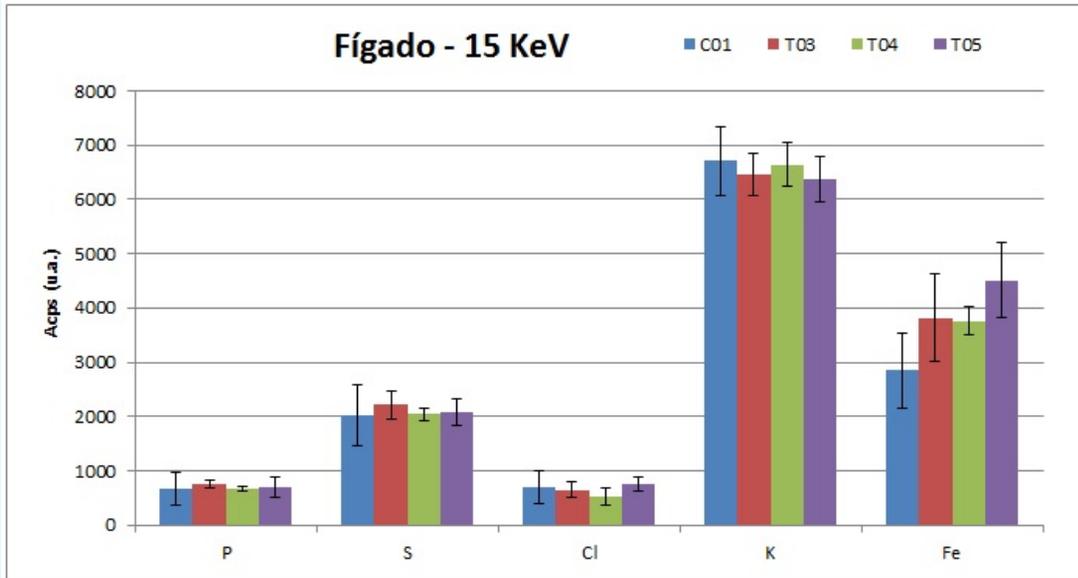


Figura 44: Resultados obtidos para amostras de fígado irradiadas com radiação raios-X com energia de 15 keV

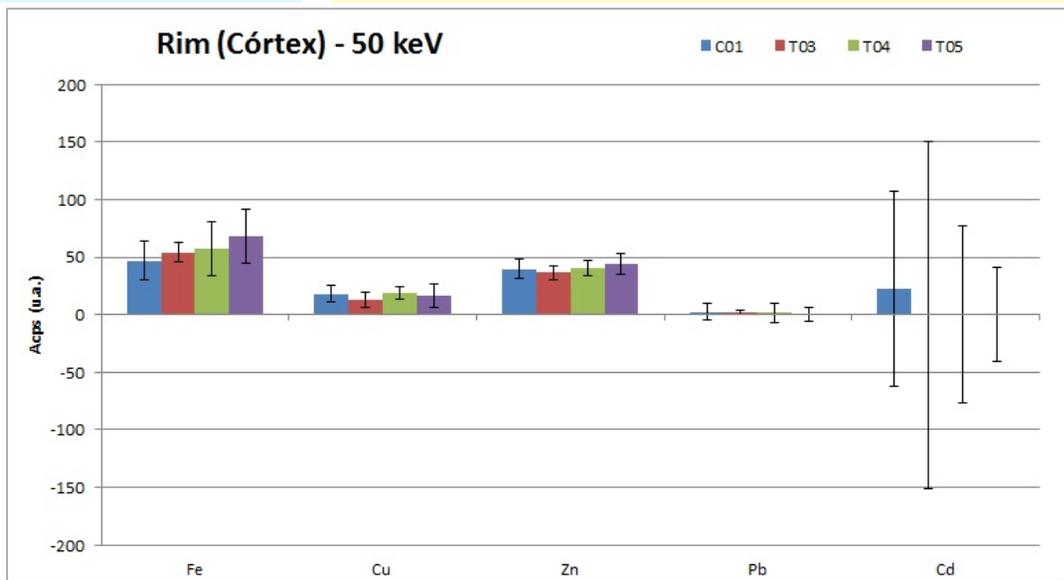


Figura 45: Resultados obtidos para amostras de rim irradiadas na zona do córtex com radiação raios-X com energia de 50 keV

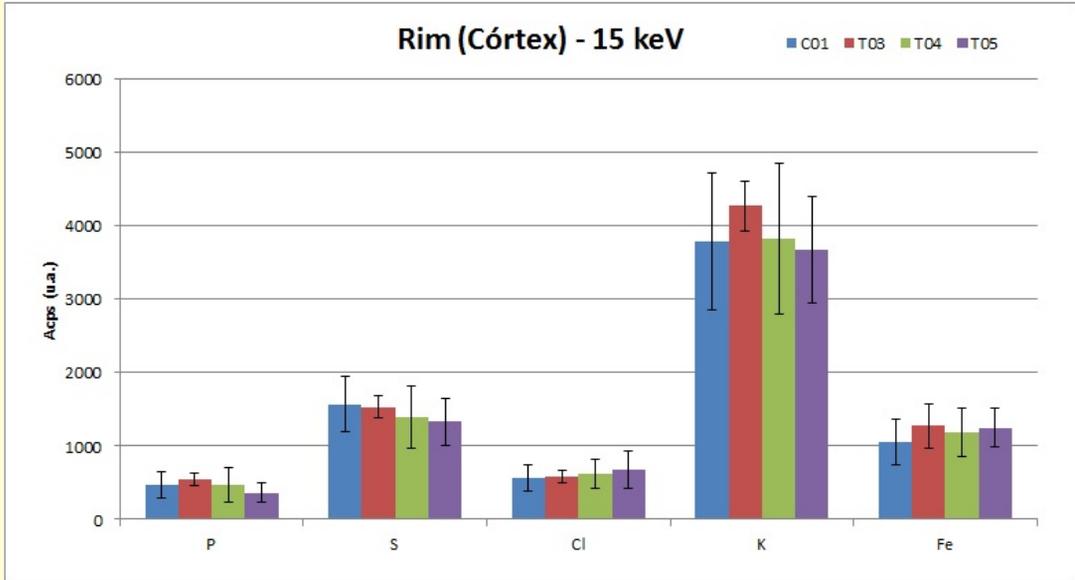


Figura 46: Resultados obtidos para amostras de rim irradiadas na zona do córtex com radiação raios-X com energia de 15 keV

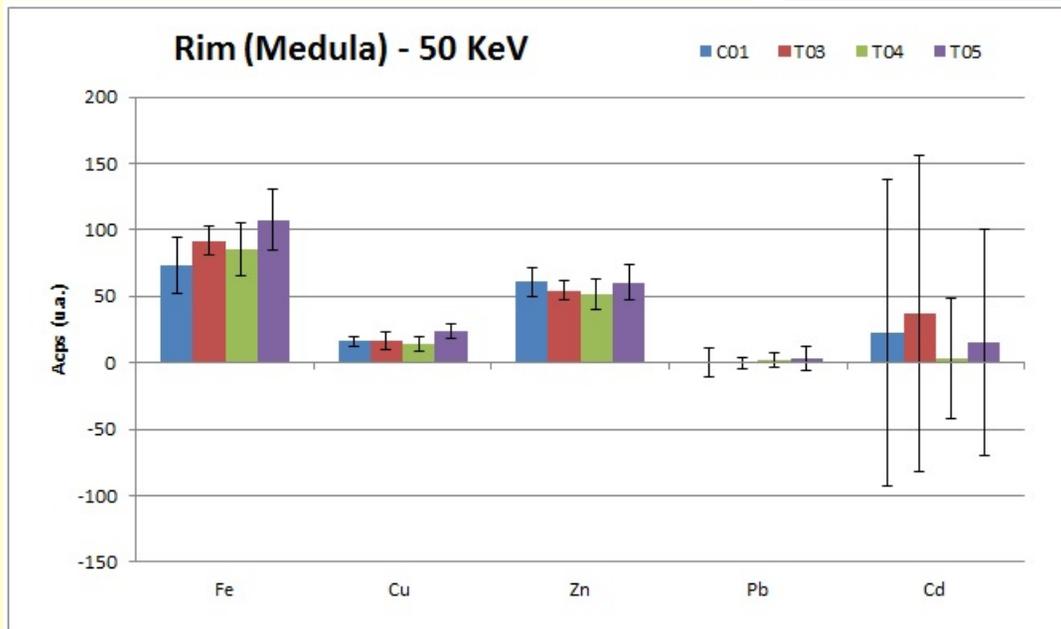


Figura 47: Resultados obtidos para amostras de rim irradiadas na zona da medula com radiação raios-X com energia de 50 keV

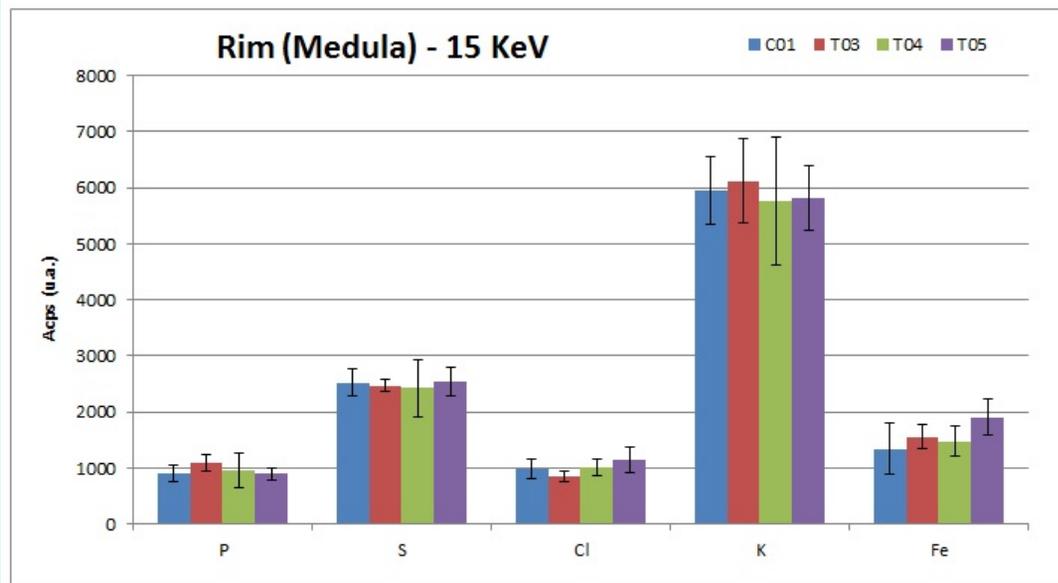


Figura 48: Resultados obtidos para amostras de rim irradiadas na zona da medula com radiação raios-X com energia de 15 keV

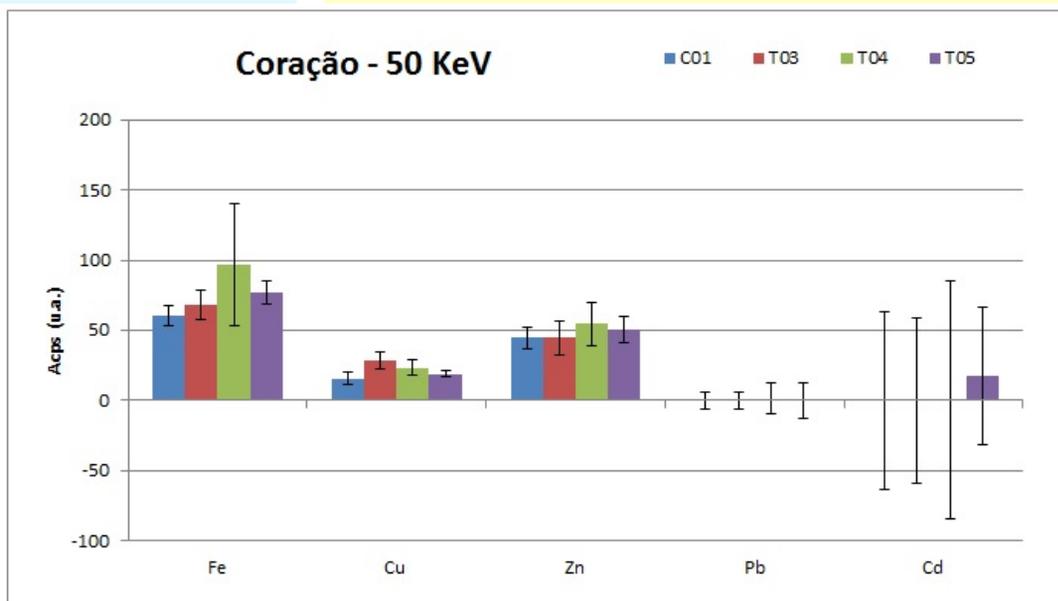


Figura 49: Resultados obtidos para amostras de coração irradiadas com radiação raios-X com energia de 50 keV

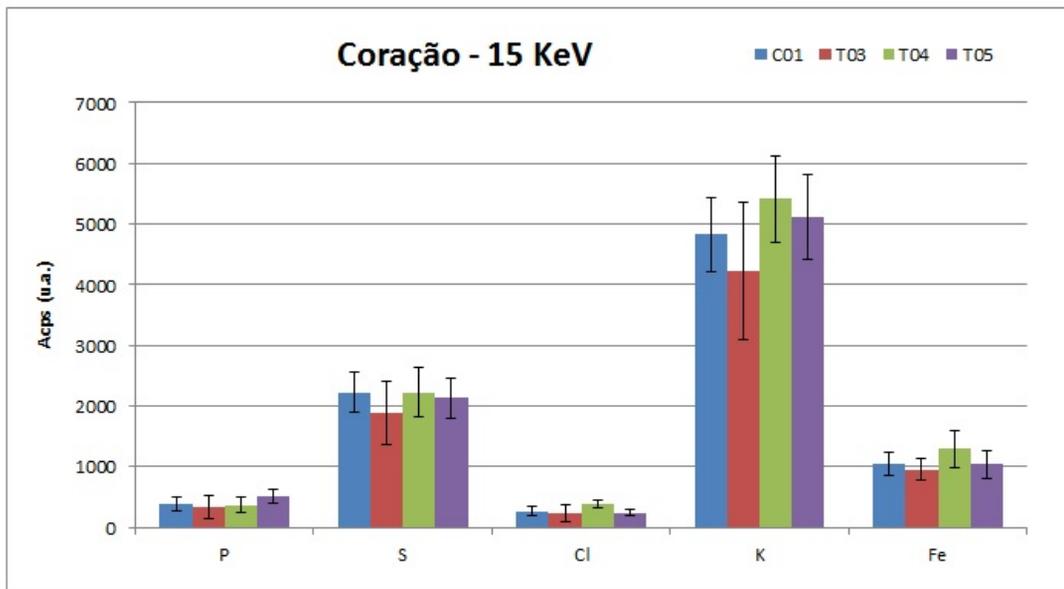


Figura 50: Resultados obtidos para amostras de coração irradiadas com radiação raios-X com energia de 15 keV

C1 - Grupo de 8 animais do sexo masculino que foram mantidos sem qualquer manipulação experimental;

T3 - Grupo de 5 animais do sexo feminino que foram sujeitos a administração de água contaminada com Cd, Pb e Zn durante 5 dias;

T4 - Grupo de 5 animais do sexo feminino que foram sujeitos a administração de água contaminada com Cd, Pb e Zn durante 10 dias;

T5 - Grupo de 5 animais do sexo feminino que foram sujeitos a administração de água contaminada com Cd, Pb e Zn durante 15 dias.

Anexo IV - Resultados finais obtidos para os grupos C1, T3, T4 e T5 comparando amostras de fígado, rim na zona do córtex, rim na zona da medula e coração.

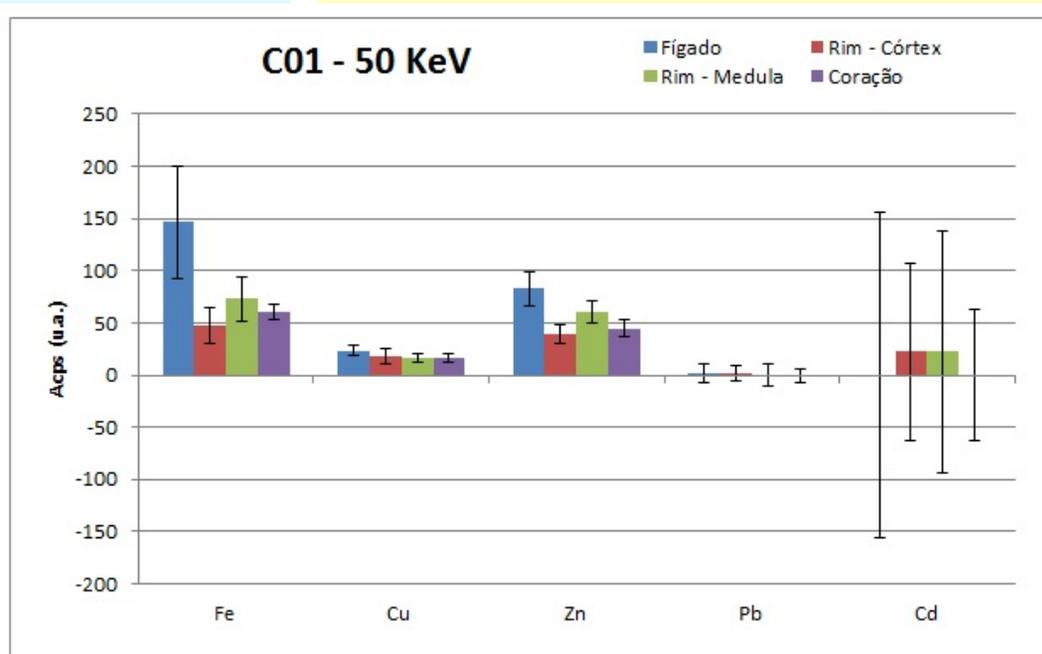


Figura 51: Resultados obtidos para o grupo C01 irradiadas com radiação raios-X com energia de 50 keV

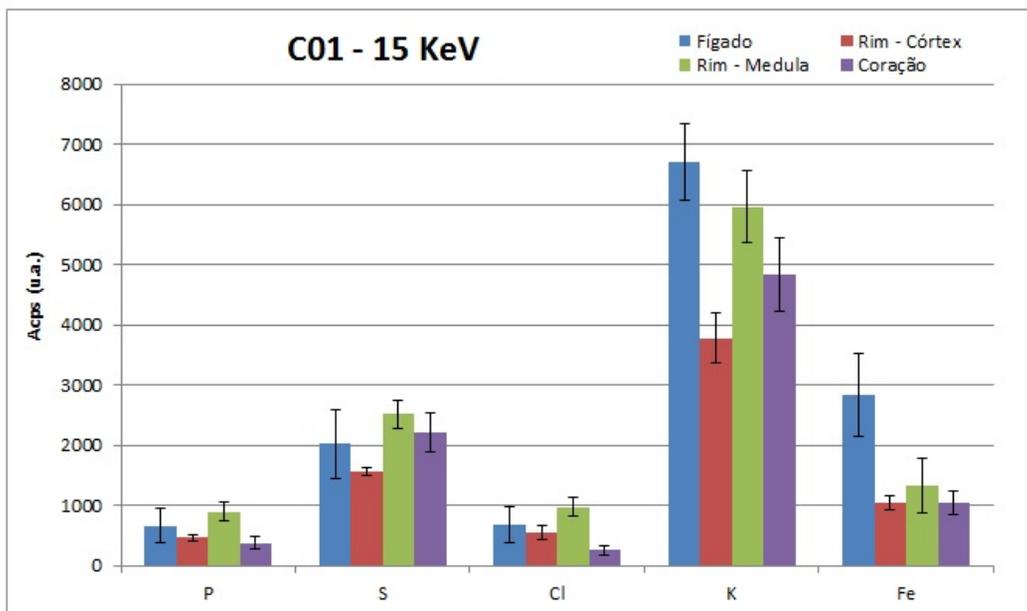


Figura 52: Resultados obtidos para o grupo C01 irradiadas com radiação raios-X com energia de 15 keV

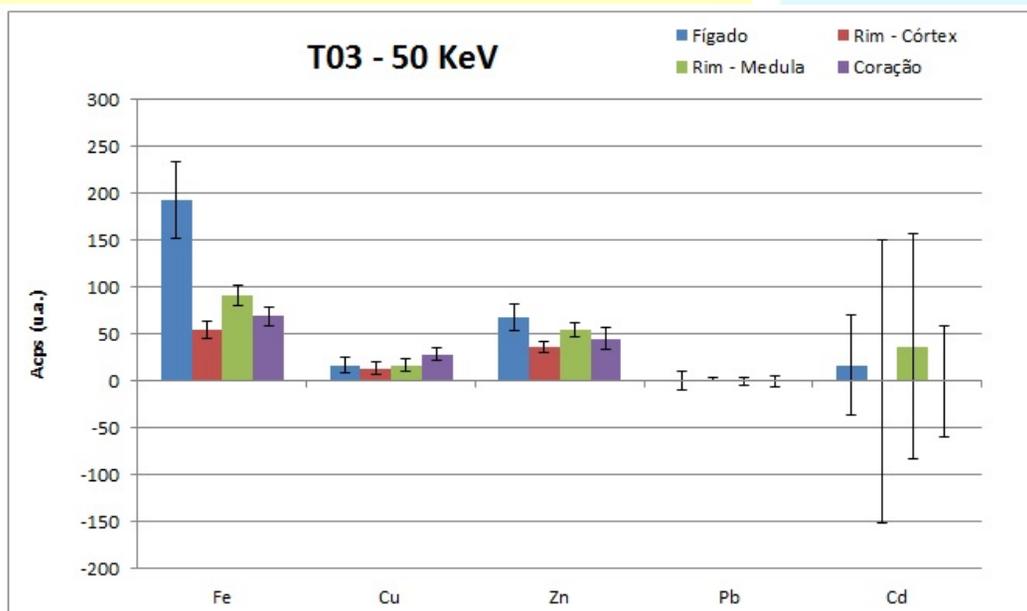


Figura 53: Resultados obtidos para o grupo T03 irradiadas com radiação raios-X com energia de 50 keV

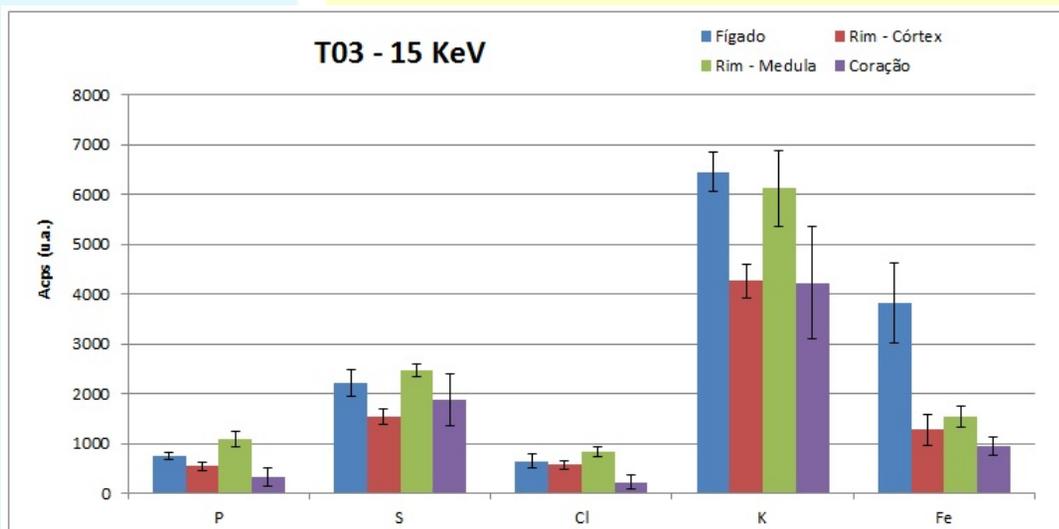


Figura 54: Resultados obtidos para o grupo T03 irradiadas com radiação raios-X com energia de 15 keV

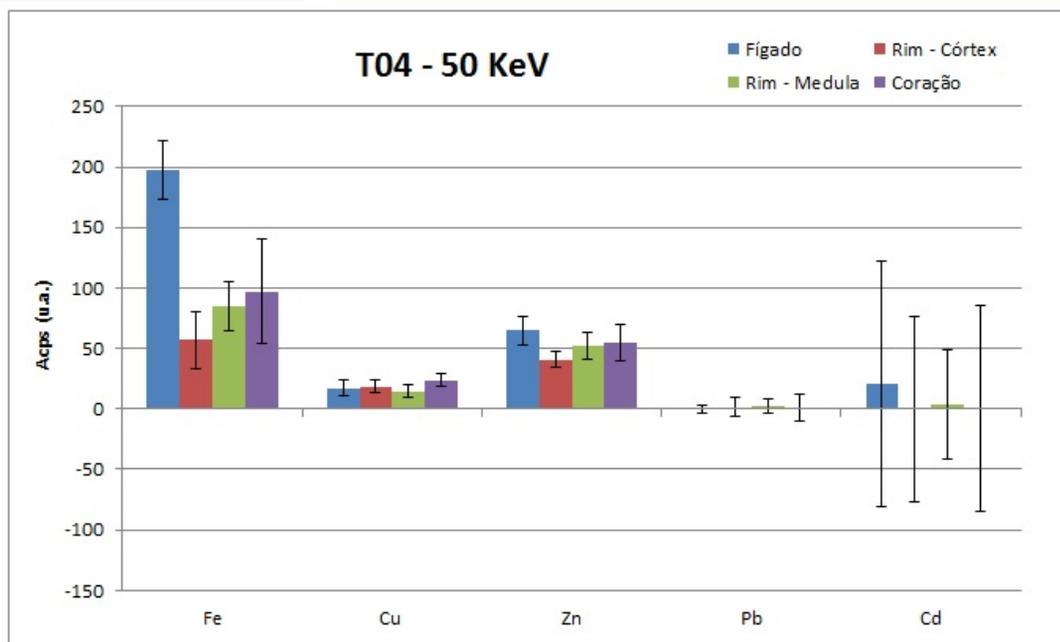


Figura 55: Resultados obtidos para o grupo T04 irradiadas com radiação raios-X com energia de 50 keV

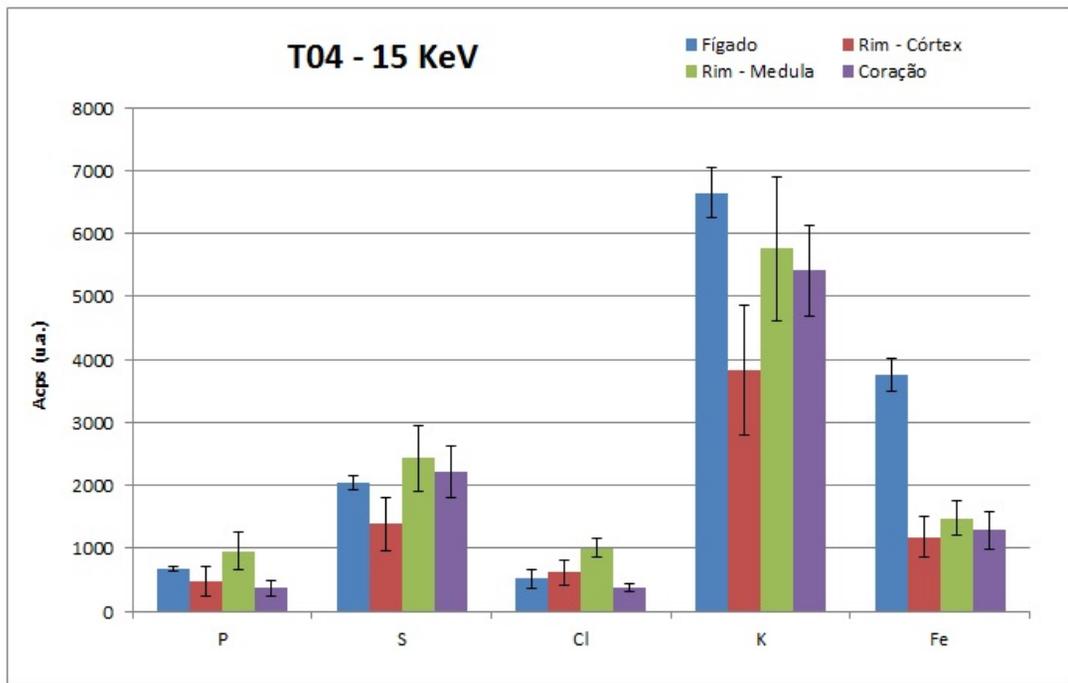


Figura 56: Resultados obtidos para o grupo T04 irradiadas com radiação raios-X com energia de 15 keV

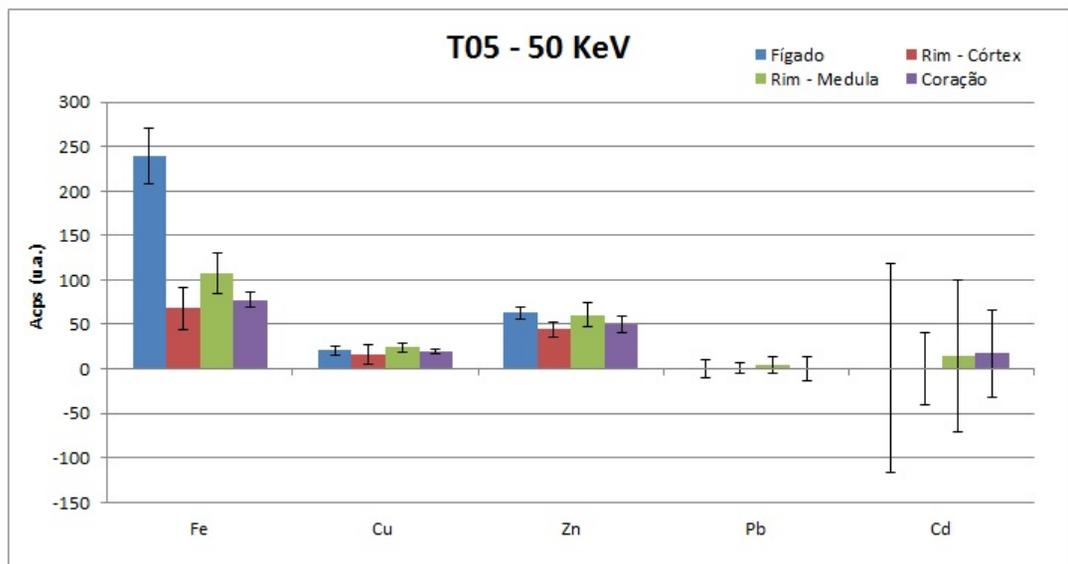


Figura 57: Resultados obtidos para o grupo T05 irradiadas com radiação raios-X com energia de 50 keV

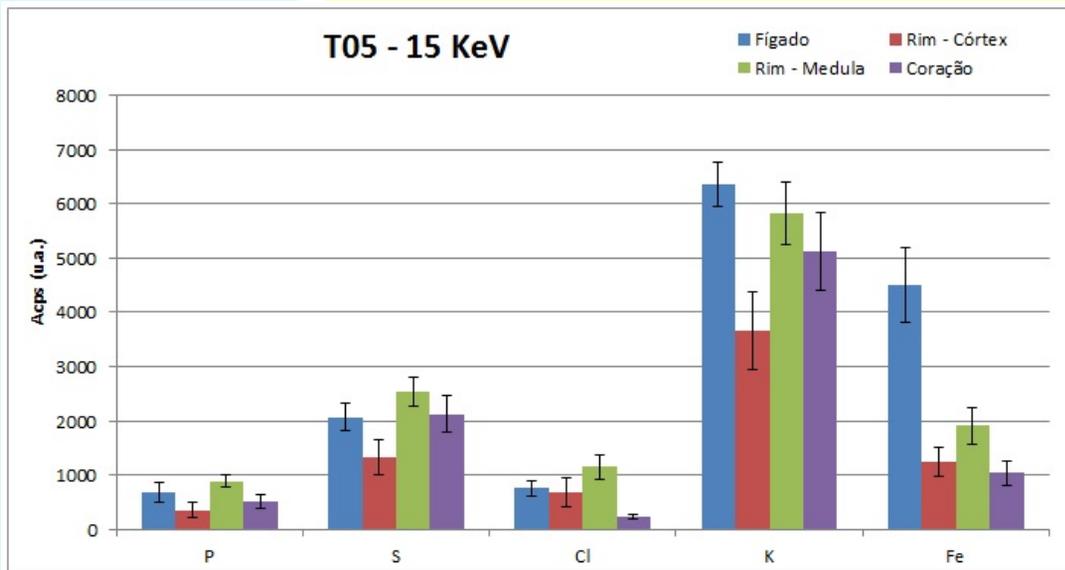


Figura 58: Resultados obtidos para o grupo T05 irradiadas com radiação raios-X com energia de 15 keV

Anexo V - Resultados finais obtidos para amostras de fígado, rim na zona do córtex, rim na zona da medula e coração comparando os grupos C1, C2, C3, T1, T2.

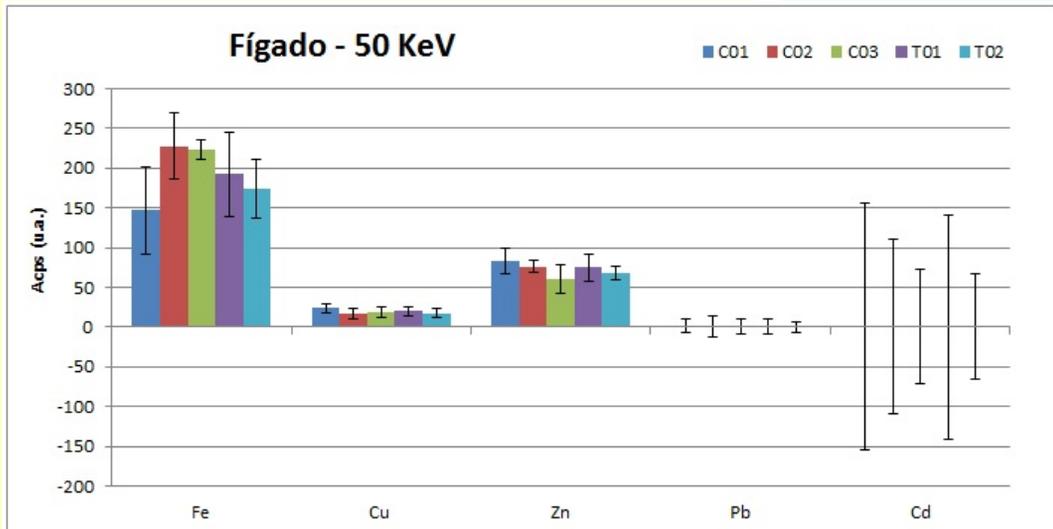


Figura 59: Resultados obtidos para amostras de fígado irradiadas com radiação raios-X com energia de 50 keV

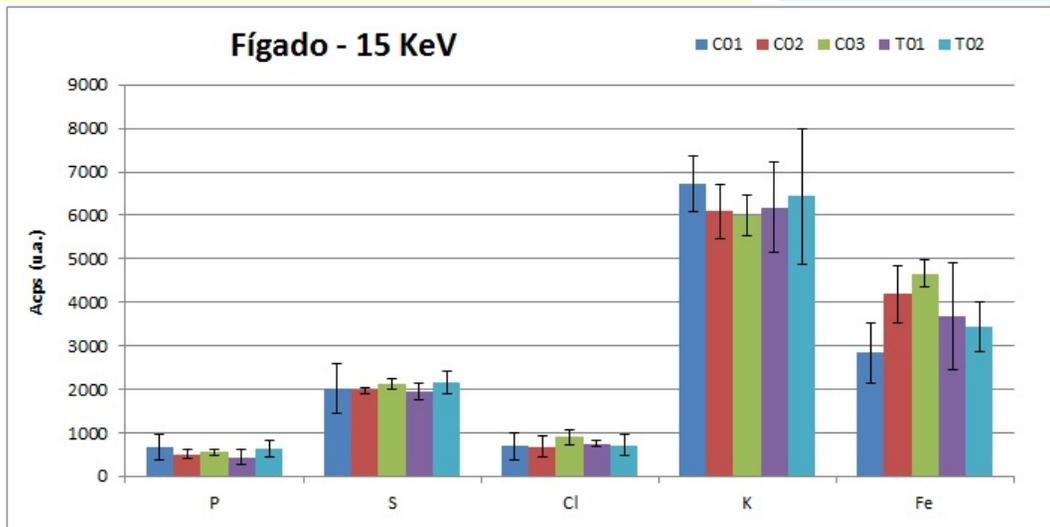


Figura 60: Resultados obtidos para amostras de fígado irradiadas com radiação raios-X com energia de 15 keV

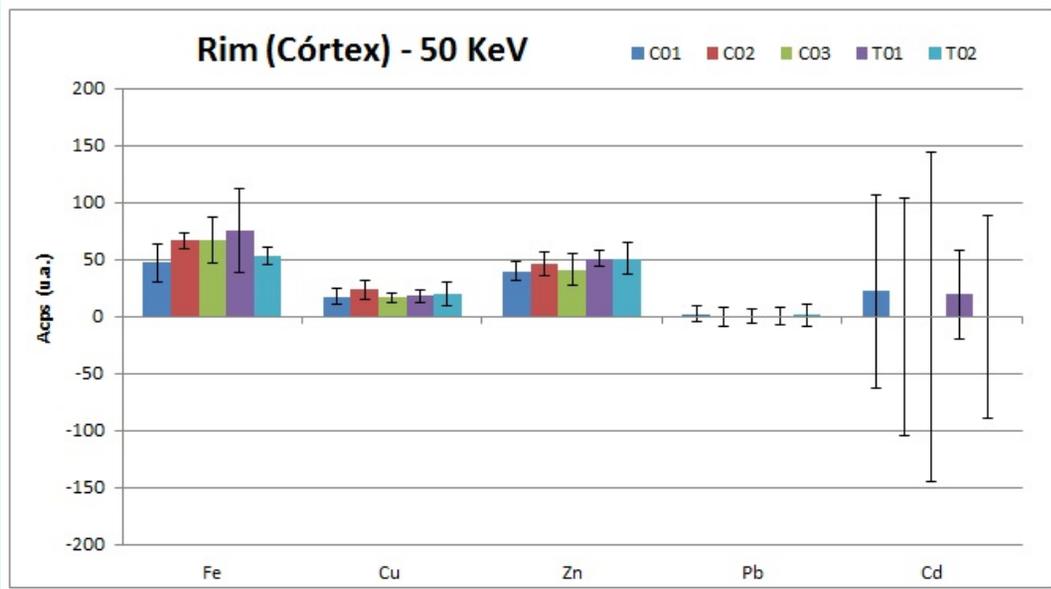


Figura 61: Resultados obtidos para amostras de rim irradiadas na zona do córtex com radiação raios-X com energia de 50 keV

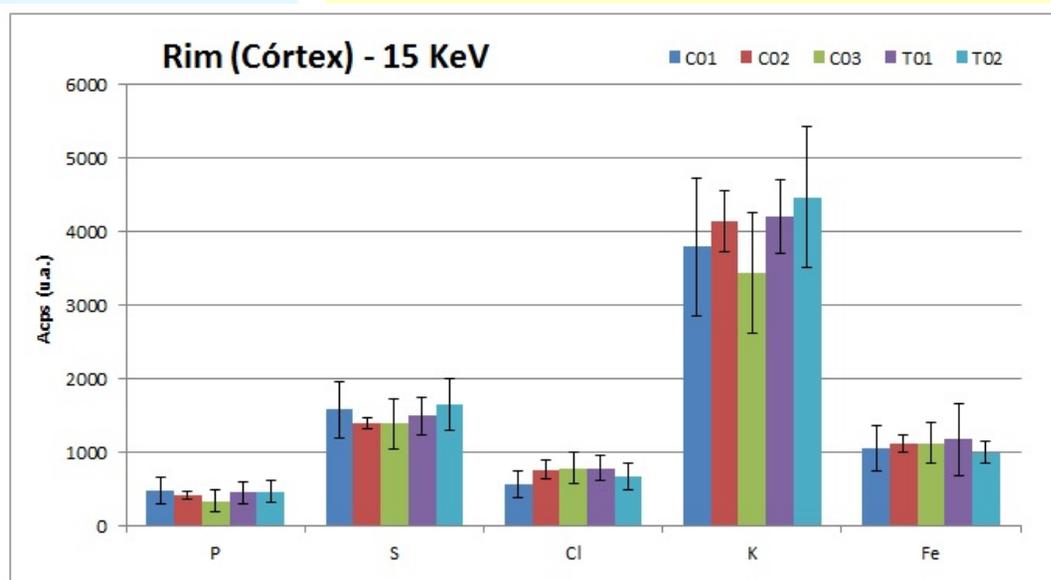


Figura 62: Resultados obtidos para amostras de rim irradiadas na zona do córtex com radiação raios-X com energia de 15 keV

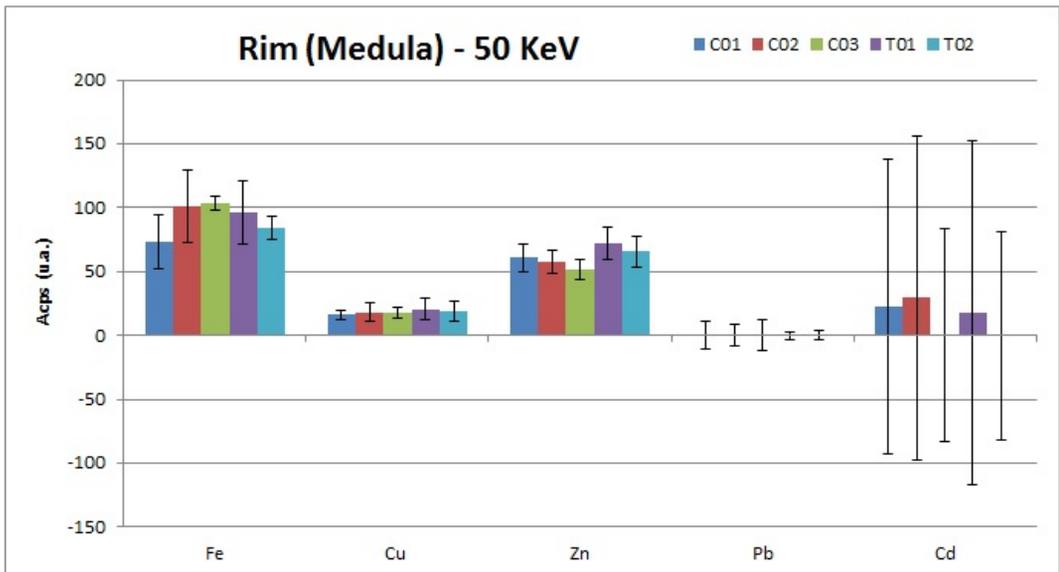


Figura 63: Resultados obtidos para amostras de rim irradiadas na zona da medula com radiação raios-X com energia de 50 keV

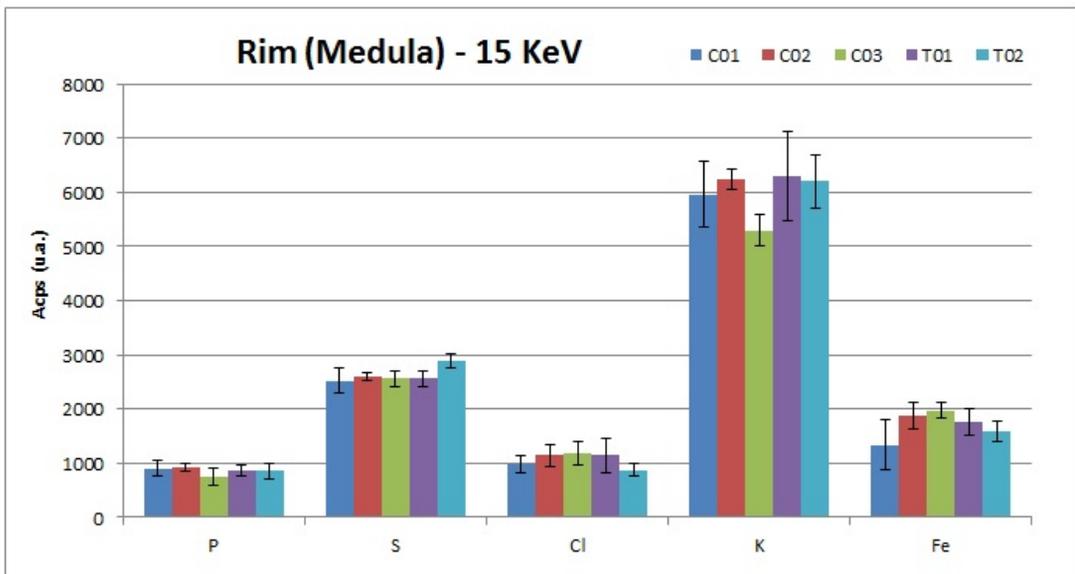


Figura 64: Resultados obtidos para amostras de rim irradiadas na zona da medula com radiação raios-X com energia de 15 keV

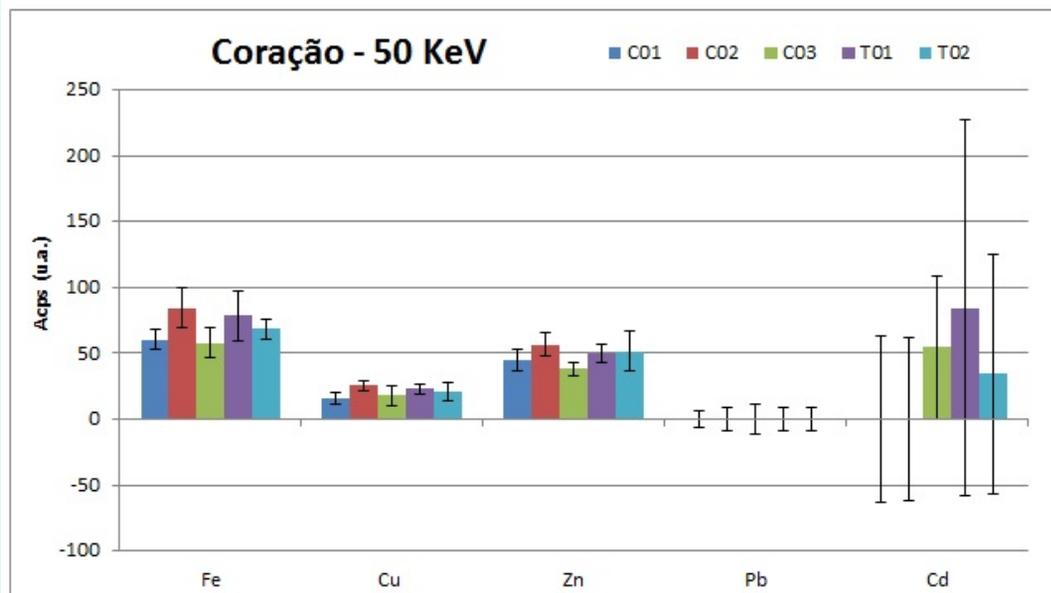


Figura 65: Resultados obtidos para amostras de coração irradiadas com radiação raios-X com energia de 50 keV

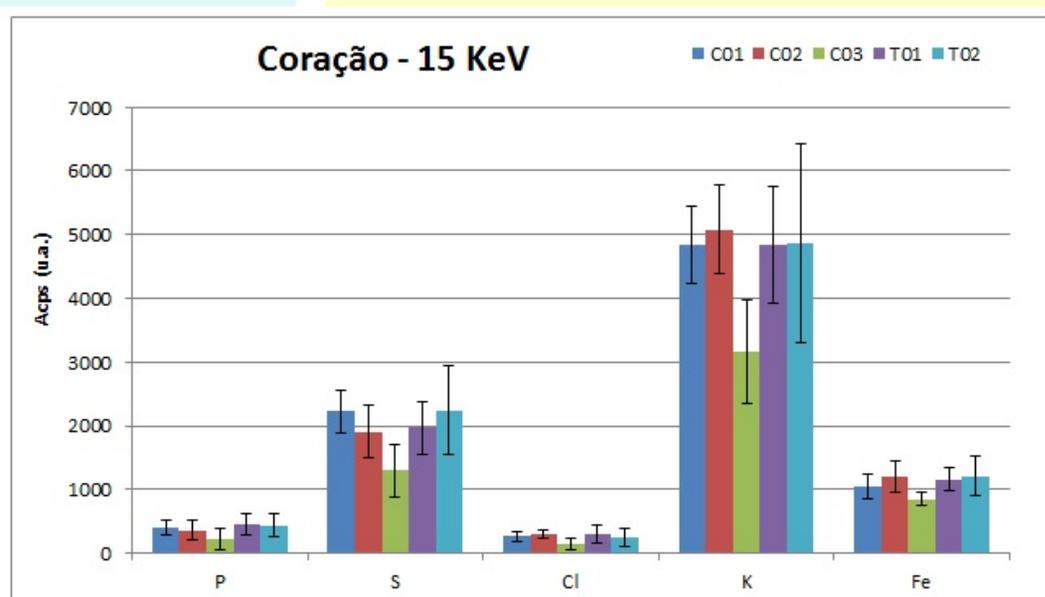


Figura 66: Resultados obtidos para amostras de coração irradiadas com radiação raios-X com energia de 15 keV

Anexo VI - Resultados finais obtidos para os grupos C2, C3, T1 e T2 comparando amostras de fígado, rim na zona do córtex, rim na zona da medula e coração.

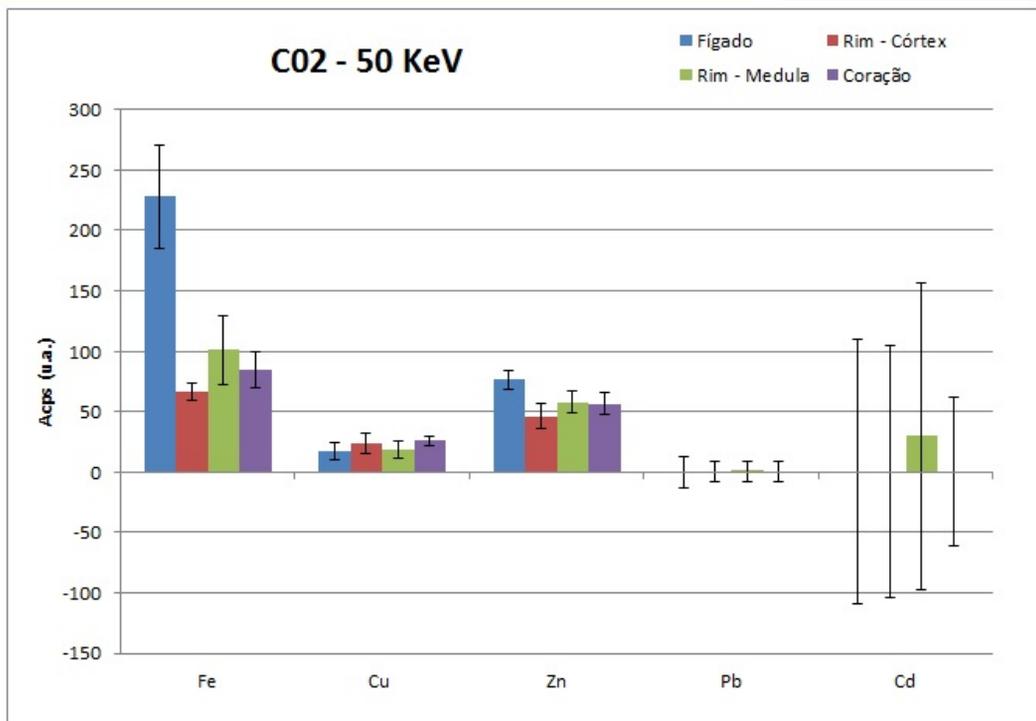


Figura 67: Resultados obtidos para o grupo C02 irradiadas com radiação raios-X com energia de 50 keV

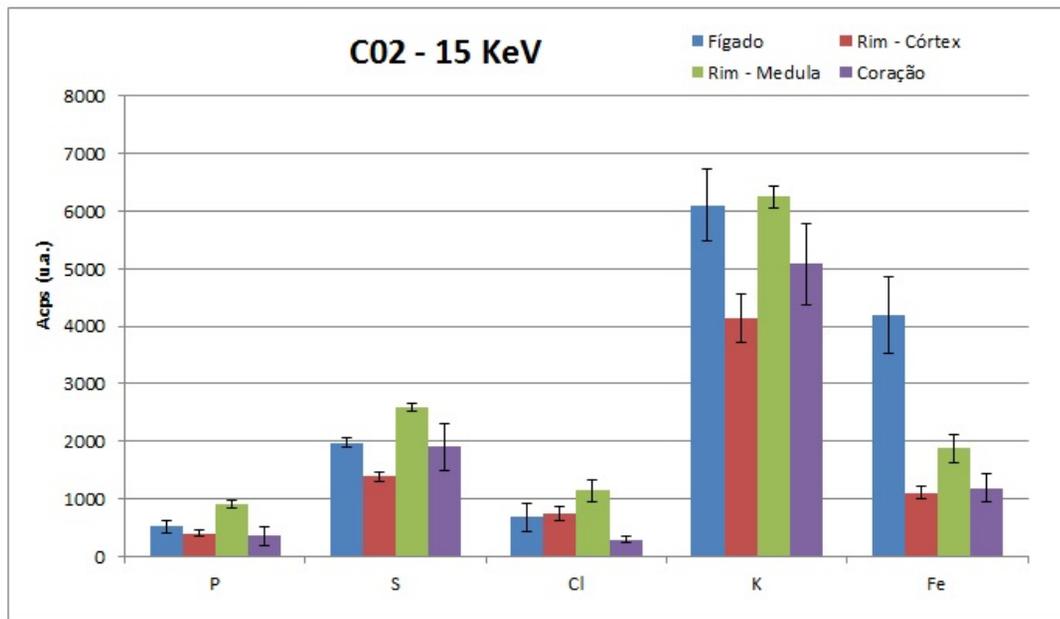


Figura 68: Resultados obtidos para o grupo C02 irradiadas com radiação raios-X com energia de 15 keV

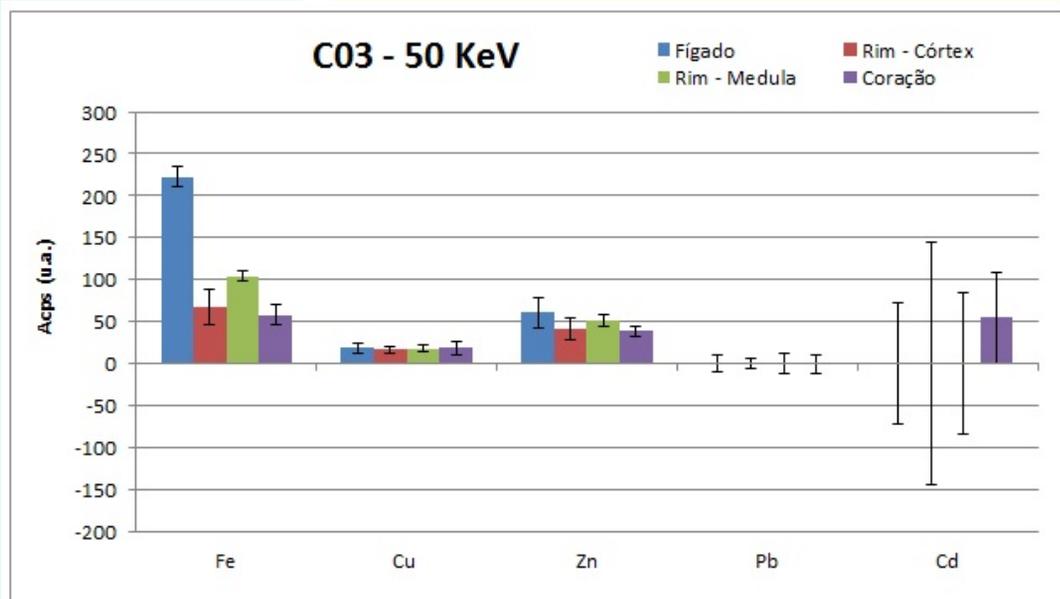


Figura 69: Resultados obtidos para o grupo C03 irradiadas com radiação raios-X com energia de 50 keV

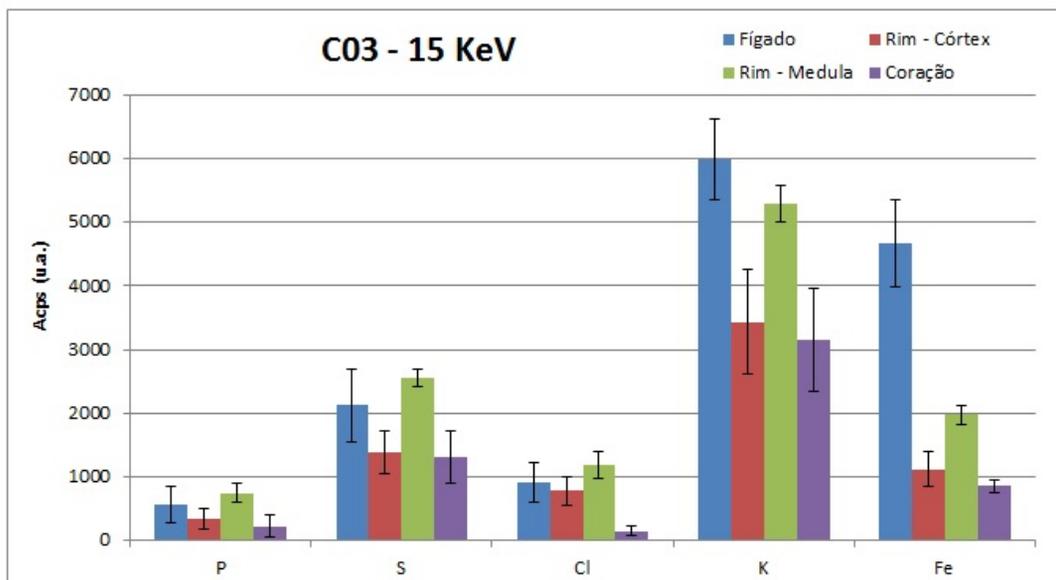


Figura 70: Resultados obtidos para o grupo C03 irradiadas com radiação raios-X com energia de 15 keV

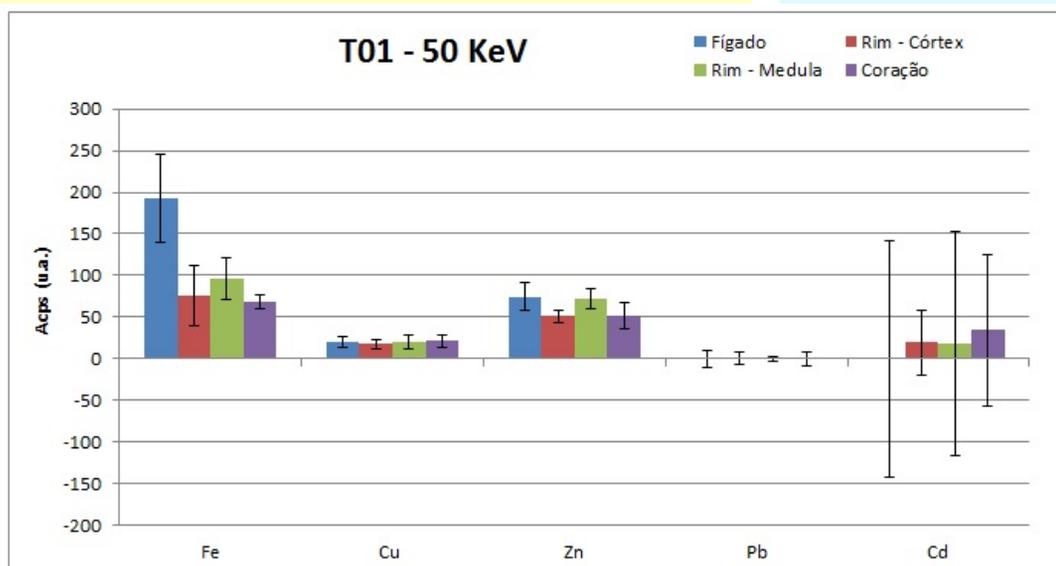


Figura 71: Resultados obtidos para o grupo T01 irradiadas com radiação raios-X com energia de 50 keV

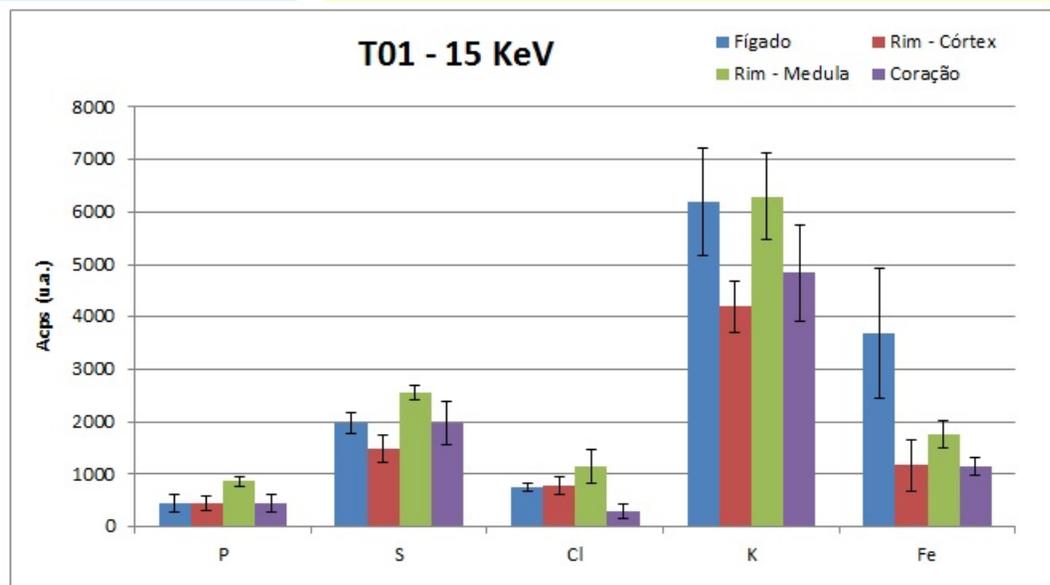


Figura 72: Resultados obtidos para o grupo T01 irradiadas com radiação raios-X com energia de 15 keV

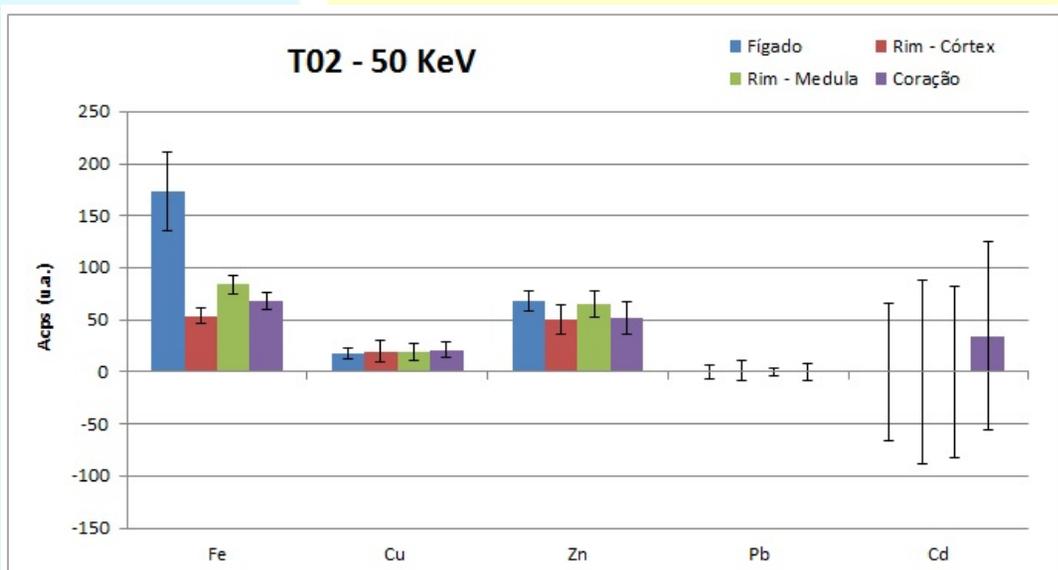


Figura 73: Resultados obtidos para o grupo T02 irradiadas com radiação raios-X com energia de 50 keV

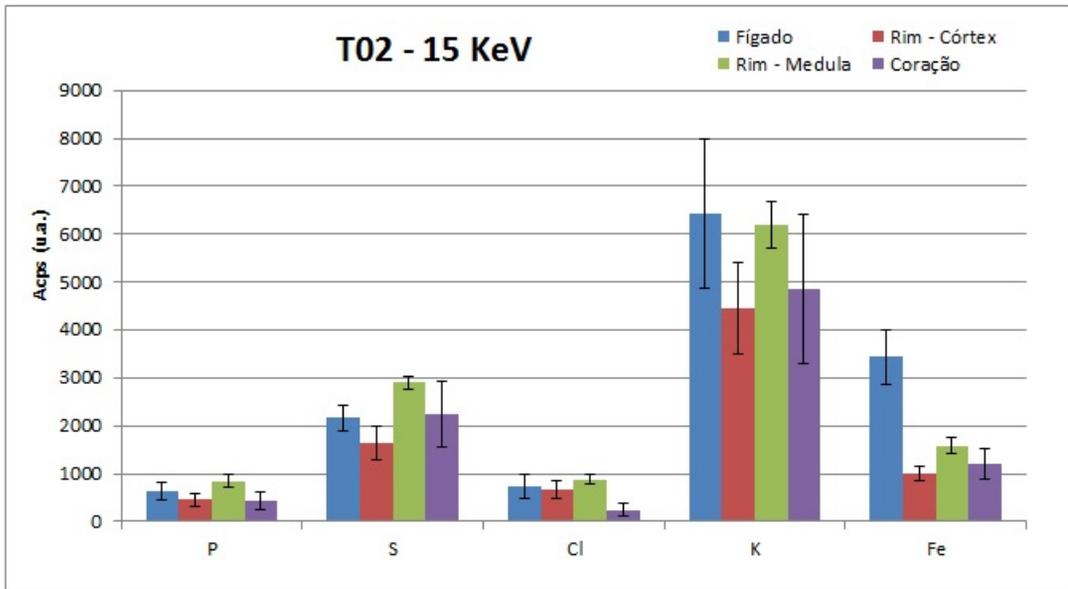


Figura 74: Resultados obtidos para o grupo T02 irradiadas com radiação raios-X com energia de 15 keV