

Flávia Rosana Meireles Teixeira

ANÁLISE MULTIELEMENTAR DE ALIMENTOS POR ESPETROMETRIA DE MASSA COM PLASMA ACOPLADO INDUTIVAMENTE

Mestrado em Química Forense

Departamento de Química

FCTUC

Setembro de 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Flávia Rosana Meireles Teixeira

**ANÁLISE MULTIELEMENTAR DE
ALIMENTOS POR ESPETROMETRIA DE
MASSA COM PLASMA ACOPLADO
INDUTIVAMENTE**

Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química Forense

Doutor Pedro Pato Martins

Professora Doutora Maria Ermelinda Eusébio

Setembro de 2017

Universidade de Coimbra

*“Os vencedores das batalhas
da vida são Homens perseverantes que,
sem se julgarem génios, convenceram-se
de que só pela perseverança
no esforço podem chegar
ao fim desejado”*

Ralph W. Emerson

Agradecimentos

Terminada esta etapa, não posso deixar de agradecer a todos aqueles que fizeram deste objetivo realidade.

Quero agradecer ao Doutor Pedro Pato, meu orientador de estágio na ALS Controlvet, por todo o apoio prestado, orientação, disponibilidade e partilha de conhecimentos ao longo desta etapa.

Quero agradecer à Professora Ermelinda Eusébio, minha orientadora do Departamento de Química, pelo apoio prestado, orientação e disponibilidade ao longo do estágio.

À Direção da ALS Controlvet quero agradecer a oportunidade que me foi concedida para realizar o estágio nas suas instalações.

Aos colaboradores da ALS Controlvet que me acompanharam neste estágio, quero agradecer pela integração, pelo acompanhamento e partilha de conhecimentos.

Agradeço também aos meus Pais pela oportunidade que me proporcionaram de chegar até aqui, pelo encorajamento e pelo orgulho que sempre demonstraram.

A mais profunda gratidão a todos!

Índice

Índice de figuras	v
Índice de tabelas	vii
Abreviaturas	xi
Resumo	xiii
Abstract	xv
1 - Introdução	3
1.1 Elementos metálicos em alimentos.....	3
1.2 Legislação.....	5
1.3 Arsénio.....	5
1.4 Cádmio.....	7
1.5 Crómio.....	9
1.6 Chumbo	9
1.7 Níquel	11
1.8 ALS Controlvet.....	11
2 - Espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS)	15
2.1 Princípio do método.....	16
2.2 Interferências	20
2.2.1 Interferências espectrais.....	20
2.2.1.1 Célula de colisão.....	21
2.2.2 Interferências não espectrais.....	22
2.2.2.1 Padrão interno	23
3 - Validação de métodos analíticos	27
3.1 Parâmetros de validação	27
3.1.1 Gama de trabalho / Linearidade.....	27
3.1.2 Limiares analíticos.....	28
3.1.3 Seletividade e especificidade	29
3.1.4 Precisão.....	29
3.1.5 Exatidão	30
3.1.6 Incertezas	31
4 – Parte Experimental	35
4.1 Equipamentos	35

4.2 Material.....	36
4.3 Gases.....	36
4.4 Reagentes e padrões.....	36
4.5 Preparação de Amostras	36
4.6 Preparação de padrões	38
4.6.1 Preparação de padrões para construção da curva de calibração	38
4.6.2 Preparação dos padrões de controlo.....	39
5 - Resultados e Discussão	43
5.1 Estabelecimento das condições analíticas e instrumentais	43
5.1.1 Seleção das massas atómicas	43
5.1.2 Verificação inicial do equipamento	44
5.1.3 Seleção de padrões internos.....	46
5.1.4 Estudo de interferências – Seleção das condições instrumentais que eliminam interferências.....	51
5.2 Validação do método de determinação de As, Cd, Pb, Cr e Ni em alimentos por ICP-MS	55
5.2.1 Linearidade	55
5.2.1.1 Análise de resíduos	57
5.2.2 Gama de trabalho.....	58
5.2.3 Análise de brancos	59
5.2.4 Limiares analíticos.....	59
5.2.5 Seletividade e Especificidade	60
5.2.6 Padrões de controlo.....	64
5.2.7 Precisão.....	67
5.2.7.1 Repetibilidade	67
5.2.7.2 Precisão intermédia.....	71
5.2.8 Exatidão	71
5.2.9 Incertezas	72
6 – Conclusão	77
Bibliografia.....	79
Anexos.....	85
Anexo I – Análise de sódio por FAAS	85
Anexo II – Performance Report	87
Anexo III – Tune Report	89

Anexo IV - Resultados obtidos nos ensaios de recuperação para todas as amostras fortificadas.....	91
Anexo V – Concentrações obtidas na leitura das amostras utilizadas para o cálculo dos limites de repetibilidade para os cinco elementos em análise	97

Índice de figuras

Figura 1.1- Instalações da ALS Controlvet	12
Figura 2.1 - ICP-MS Agilent 7900 e principais componentes	16
Figura 2.2 – Representação esquemática do sistema de introdução de amostra em ICP-MS utilizando a câmara de pulverização de dupla passagem e o nebulizador.....	17
Figura 2.3 – Representação esquemática de uma tocha de ICP	17
Figura 2.4 - Representação esquemática da zona de interface	18
Figura 2.5 - Esquema representativo de um filtro de massa de quadrupolo.....	19
Figura 2.6 - Esquema representativo de um detetor do tipo multiplicador de eletrões	20
Figura 2.7 - Esquema representativo da colisão de He com a molécula $40\text{Ar}35\text{Cl}$ na célula de colisão.....	22
Figura 4.1 - Fotografia do ICP-MS Agilent 7900 utilizado na realização do trabalho experimental	35
Figura 5.1 - Resultados obtidos para arsénio e padrões internos, no padrão P2 em seis ensaios consecutivos.....	47
Figura 5.2 - Resultados obtidos para arsénio e padrões internos na amostra teste sem diluição, em seis ensaios consecutivos	47
Figura 5.3 - Resultados obtidos para arsénio e para os padrões internos na amostra teste com fator de diluição 10, em seis ensaios consecutivos.....	47
Figura 5.4 - Resultados obtidos para arsénio e para os padrões internos, para a amostra teste e para as diferentes diluições – efeito de variação de matriz.....	47
Figura 5.5 - Resultados obtidos para cádmio e padrões internos, no padrão P2 em seis ensaios consecutivos.....	48
Figura 5.6 - Resultados obtidos para cádmio e padrões internos na amostra teste sem diluição, em seis ensaios consecutivos	48
Figura 5.7 - Resultados obtidos para cádmio e padrões internos na amostra teste com fator de diluição 10, em seis ensaios consecutivos	48
Figura 5.8 - Resultados obtidos para cádmio e para os padrões internos, para a amostra teste e para as diferentes diluições – efeito de variação de matriz.....	48
Figura 5.9 - Resultados obtidos para chumbo e padrões internos, no padrão P2 em seis ensaios consecutivos.....	48
Figura 5.10 - Resultados obtidos para chumbo e padrões internos na amostra teste sem diluição, em seis ensaios consecutivos.....	48
Figura 5.11 - Resultados obtidos para chumbo e padrões internos na amostra teste com fator de diluição 10, em seis ensaios consecutivos	49

Figura 5.12 - Resultados obtidos para chumbo e para os padrões internos, para a amostra teste e para as diferentes diluições – efeito de variação de matriz	49
Figura 5.13 - Resultados obtidos para crómio e padrões internos, no padrão P2 em seis ensaios consecutivos.....	49
Figura 5.14 - Resultados obtidos para crómio e padrões internos na amostra teste sem diluição, em seis ensaios consecutivos	49
Figura 5.15 - Resultados obtidos para crómio e padrões internos na amostra teste com fator de diluição 10, em seis ensaios consecutivos	49
Figura 5.16 - Resultados obtidos para crómio e para os padrões internos, para a amostra teste e para as diferentes diluições – efeito de variação de matriz	49
Figura 5.17 - Resultados obtidos para níquel e padrões internos, no padrão P2 em seis ensaios consecutivos.....	50
Figura 5.18 - Resultados obtidos para níquel e padrões internos na amostra teste sem diluição, em seis ensaios consecutivos	50
Figura 5.19 - Resultados obtidos para níquel e padrões internos na amostra teste com fator de diluição 10, em seis ensaios consecutivos	50
Figura 5.20 - Resultados obtidos para níquel e para os padrões internos, para a amostra teste e para as diferentes diluições – efeito de variação de matriz.....	50
Figura 5.21 - Sinal obtido para $m/z = 75$ no padrão “P3” para diferentes fluxos de He na célula de colisão, na ausência de cloretos (azul) e com 100 ppm de cloretos (laranja).....	52
Figura 5.22 - Sinal obtido para $m/z = 75$ no padrão “P3” para diferentes fluxos de He na célula de colisão na ausência de cloretos (azul) e com 500 ppm de cloretos (laranja).....	53
Figura 5.23 - Razão entre o sinal para $m/z = 75$ no padrão "P3" contaminado com diferentes concentrações de cloretos e num padrão isento de cloretos. Modo sem gás	53
Figura 5.24 - Razão entre o sinal para $m/z = 75$ no padrão "P3" contaminado com diferentes concentrações de cloretos e num padrão isento de cloretos. Fluxo de He 5 ml/min	54
Figura 5.25 - Razão sinal-ruído para $m/z = 75$ na presença de 500 ppm de cloretos	54
Figura 5.26 - Representação gráfica da curva de calibração obtida para o arsénio.....	56
Figura 5.27 - Representação gráfica da curva de calibração obtida para o cádmio	56
Figura 5.28 - Representação gráfica da curva de calibração obtida para o chumbo	56
Figura 5.29 - Representação gráfica da curva de calibração obtida para o crómio	57
Figura 5.30 - Representação gráfica da curva de calibração obtida para o níquel	57
Figura 5.31 - Carta de controlo obtida para o PC de As.....	65
Figura 5.32 - Carta de controlo obtida para o PC de Cd	65
Figura 5.33 - Carta de controlo obtida para o PC de Pb.....	65
Figura 5.34 - Carta de controlo obtida para o PC de Cr	66
Figura 5.35 - Carta de controlo obtida para o PC de Ni.....	66

Índice de tabelas

Tabela 1.1 - Teores máximos de arsénio na forma inorgânica admissíveis em géneros alimentícios [9].....	6
Tabela 1.2 - Teores máximos de cádmio admissíveis em géneros alimentícios [8].....	8
Tabela 1.3 – Exemplos de teores máximos de chumbo admissíveis em géneros alimentícios [7]	10
Tabela 4.1 - Amostras utilizadas para a realização do trabalho experimental	37
Tabela 4.2 - Programa de digestão	37
Tabela 4.3 - Preparação dos padrões para construção da curva de calibração	38
Tabela 4.4 - Preparação dos padrões de controlo	39
Tabela 5.1 - Isótopos dos elementos em análise, recomendados na literatura para quantificação por ICP-MS.....	43
Tabela 5.2 - Isótopos dos elementos em estudo selecionados para a validação do método ..	44
Tabela 5.3 - Seleção de padrões internos	51
Tabela 5.4 - Resultados obtidos na análise de resíduos.....	58
Tabela 5.5 - Gamas de trabalho para cada um dos elementos em análise.....	59
Tabela 5.6 - Critérios de aceitação de brancos	59
Tabela 5.7 - Limiares analíticos obtidos para os elementos em estudo.....	60
Tabela 5.8 - Resultados obtidos para o arsénio nos ensaios de recuperação de amostras alimentares fortificadas	61
Tabela 5.9 - Resultados obtidos para o cádmio nos ensaios de recuperação de amostras alimentares fortificadas	61
Tabela 5.10 - Resultados obtidos para o chumbo nos ensaios de recuperação de amostras alimentares fortificadas	62
Tabela 5.11 - Resultados obtidos para o crómio nos ensaios de recuperação de amostras alimentares fortificadas	62
Tabela 5.12 - Resultados obtidos para o níquel nos ensaios de recuperação de amostras alimentares fortificadas	63
Tabela 5.13 - Resultados globais obtidos nos ensaios de recuperação de amostras alimentares fortificadas com os elementos em análise.....	63
Tabela 5.14 - Padrões de controlo correspondentes ao nível do primeiro padrão das curvas de calibração.....	64
Tabela 5.15 - Resultados obtidos nas cartas de controlo construídas para os padrões de controlo dos 5 elementos em análise.....	66
Tabela 5.16 - Limites de repetibilidade e coeficientes de variação de repetibilidade para o arsénio	68
Tabela 5.17 - Limites de repetibilidade e coeficientes de variação de repetibilidade para o cádmio	68
Tabela 5.18 - Limites de repetibilidade e coeficientes de variação de repetibilidade para o chumbo	69
Tabela 5.19 - Limites de repetibilidade e coeficientes de variação de repetibilidade para o crómio.....	69

Tabela 5.20 - Limites de repetibilidade e coeficientes de variação de repetibilidade para o níquel	70
Tabela 5.21 - Limites de repetibilidade globais e coeficientes de variação de repetibilidade para os cinco elementos em análise.....	70
Tabela 5.22 - Resultados obtidos na análise de duplicados para os cinco elementos em análise.....	71
Tabela 5.23 - Z-scores obtidos através da análise de MRC	72
Tabela 5.24 - Incertezas obtidas na análise dos elementos em estudo	73
Tabela IV.1 - Resultados obtidos nas 10 réplicas de recuperações da amostra refeição para os 5 elementos em estudo	91
Tabela IV.2 - Resultados obtidos nas 10 réplicas de recuperações da amostra chá para os 5 elementos em estudo	91
Tabela IV.3 - Resultados obtidos nas 10 réplicas de recuperações da amostra rolinho com queijo e fiambre para os 5 elementos em estudo	91
Tabela IV.4 - Resultados obtidos nas 10 réplicas de recuperações da amostra iogurte líquido para os 5 elementos em estudo	92
Tabela IV.5 - Resultados obtidos nas 10 réplicas de recuperações da amostra cenoura para os 5 elementos em estudo	92
Tabela IV.6 - Resultados obtidos nas 10 réplicas de recuperações da amostra cereais para os 5 elementos em estudo	92
Tabela IV.7 - Resultados obtidos nas 10 réplicas de recuperações da amostra salmão para os 5 elementos em estudo	93
Tabela IV.8 - Resultados obtidos nas 10 réplicas de recuperações da amostra leite para os 5 elementos em estudo	93
Tabela IV.9 - Resultados obtidos nas 10 réplicas de recuperações da amostra requeijão para os 5 elementos em estudo	93
Tabela IV.10 - Resultados obtidos nas 10 réplicas de recuperações da amostra açúcar para os 5 elementos em estudo	94
Tabela IV.11 - Resultados obtidos nas 10 réplicas de recuperações da amostra gengibre para os 5 elementos em estudo	94
Tabela IV.12 - Resultados obtidos nas 10 réplicas de recuperações da amostra carne de peru para os 5 elementos em estudo	94
Tabela IV.13 - Resultados obtidos nas 10 réplicas de recuperações da amostra filete de pescada para os 5 elementos em estudo	95
Tabela IV.14 - Resultados obtidos nas 10 réplicas de recuperações da amostra aguardente para os 5 elementos em estudo	95
Tabela IV.15 - Resultados obtidos nas 10 réplicas de recuperações da amostra ovos de consumo para os 5 elementos em estudo.....	95
Tabela V.1 – Resultados de repetibilidade obtidos na leitura das 10 réplicas da amostra refeição para os 5 elementos em estudo	97
Tabela V.2 – Resultados de repetibilidade obtidos na leitura das 10 réplicas da amostra chá para os 5 elementos em estudo	97
Tabela V.3 – Resultados de repetibilidade obtidos na leitura das 10 réplicas da amostra rolinho com queijo e fiambre para os 5 elementos em estudo.....	97
Tabela V.4 – Resultados de repetibilidade obtidos na leitura das 10 réplicas da amostra iogurte líquido para os 5 elementos em estudo	98

Tabela V.5 – Resultados de repetibilidade obtidos na leitura das 10 réplicas da amostra cenoura para os 5 elementos em estudo	98
Tabela V.6 – Resultados de repetibilidade obtidos na leitura das 10 réplicas da amostra cereais para os 5 elementos em estudo	98
Tabela V.7 – Resultados de repetibilidade obtidos na leitura das 10 réplicas da amostra salmão para os 5 elementos em estudo.....	99
Tabela V.8 – Resultados de repetibilidade obtidos na leitura das 10 réplicas da amostra leite para os 5 elementos em estudo	99
Tabela V.9 - Resultados de repetibilidade obtidos na leitura das 10 réplicas da amostra requeijão para os 5 elementos em estudo	99
Tabela V.10 – Resultados de repetibilidade obtidos na leitura das 10 réplicas da amostra açúcar para os 5 elementos em estudo.....	100
Tabela V.11 – Resultados de repetibilidade obtidos na leitura das 10 réplicas da amostra gengibre para os 5 elementos em estudo	100
Tabela V.12 – Resultados de repetibilidade obtidos na leitura das 10 réplicas da amostra carne de peru para os 5 elementos em estudo.....	100
Tabela V.13 – Resultados de repetibilidade obtidos na leitura das 10 réplicas da amostra filete de pescada para os 5 elementos em estudo	101
Tabela V.14 – Resultados de repetibilidade obtidos na leitura das 10 réplicas da amostra aguardente para os 5 elementos em estudo.....	101
Tabela V.15 - Resultados de repetibilidade obtidos na leitura das 10 réplicas da amostra ovos de consumo para os 5 elementos em estudo	101

Abreviaturas

AAS	Espetrometria de Absorção Atômica
AAFCO	Do inglês: <i>Association of American Feed Control Officials</i>
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
CE	Comissão Europeia
CPS	Contagens por Segundo
CV	Coefficiente de Variação
EFSA	Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar
EIL	Ensaio Interlaboratoriais
FAAS	Espetrometria de Absorção Atômica de Chama
FAPAS	Do inglês: <i>Food Analysis Performance Assessment Scheme</i>
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
GFAAS	Espetrometria de Absorção Atômica com Câmara de Grafite
IARC	Agência Internacional de Pesquisa sobre o Cancro
ICP-AES	Espetrometria de Emissão Atômica com Plasma Acoplado Indutivamente
ICP-MS	Espetrometria de Massa com Plasma Acoplado Indutivamente
IPAC	Instituto Português de Acreditação
ISIS	Do inglês: <i>Integrated Sample Introduction System</i>
LC	Limite Central
LD	Limite de Detecção
LIA	Limite Inferior de Aviso
LIC	Limite Inferior de Controlo
LSA	Limite Superior de Aviso
LSC	Limite Superior de Controlo
LQ	Limite de Quantificação
MRC	Material de Referência Certificado
OMS	Organização Mundial de Saúde
PC	Padrão de Controlo
PFA	Perfluoroalcóxido
PTWI	Ingestão Semanal Tolerável Provisório
TDI	Ingestão Diária Tolerável
TWI	Ingestão Semanal Tolerável
UE	União Europeia

Resumo

O presente trabalho foi desenvolvido no laboratório ALS Controlvet e teve como objetivo a validação de um método para determinação de elementos metálicos em alimentos por espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS).

O método desenvolvido envolveu a análise simultânea de arsénio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), crómio (Cr) e níquel (Ni), elementos considerados como uns dos mais tóxicos pela Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA), numa gama considerável de amostras, com objetivo de ser representativa das amostras lidas em rotina no laboratório.

O método em estudo foi adaptado de dois métodos normalizados, a EPA 200.8: *Determination of Trace Elements in Waters and wastes by ICP-MS* e a EPA 6020A: *Inductively coupled plasma-mass spectrometry*.

De forma a confirmar a adequabilidade do método aos objetivos do laboratório foram avaliados os parâmetros: seleção de massas atómicas, seleção de padrões internos, estudo de interferências, linearidade, gama de trabalho, seletividade e especificidade, limite de quantificação, limite de deteção, precisão, exatidão e incertezas.

Os limites de quantificação obtidos em massa/massa para cada um dos elementos foram de 0,06 mg/kg para o arsénio, 0,01 mg/kg para o cádmio, 0,20 mg/kg para o chumbo, 0,05 mg/kg para o crómio e 0,15 mg/kg para níquel. Em ensaios de recuperação obtiveram-se valores entre 93 e 103%. No estudo de repetibilidade registaram-se coeficientes de variação inferiores a 10%, e para a amplitude média relativa, medida da precisão intermédia obtiveram-se valores inferiores a 10%. A exatidão foi avaliada com materiais de referência certificados (MRC), obtendo-se sempre valores de *z-score* inferiores a 2. A incerteza é 8% para o arsénio, cádmio e chumbo, 16% para o chumbo e 7% para o crómio.

Os resultados obtidos para os parâmetros de validação permitem concluir que o método se encontra validado.

Palavras-chave: Metais em Alimentos; Espectrometria de Massa com Plasma Indutivo Acoplado; Análise Multielementar; Validação de Métodos Analíticos

Abstract

This work was developed at ALS Controlvet with the purpose to validate a method for determination of metals in food by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS).

The method developed involved simultaneous analysis of arsenic (As), cadmium (Cd), lead (Pb), chromium (Cr) and nickel (Ni), elements considered as some of the most toxic by European Food Safety Authority (EFSA), in a considerable range of samples, representative of the samples routinely analysed in the laboratory.

The method was adapted from two standard methods, EPA 200.8: Determination of Trace Elements in Waters and wastes by ICP-MS and EPA 6020A: Inductively coupled plasma-mass spectrometry.

To confirm the suitability of the method to the laboratory objectives, several parameters were evaluated namely atomic mass, internal standards, interferences, linearity, work range, selectivity and specificity, quantification limit, detection limit, precision, accuracy and uncertainties.

Quantification limits obtained in mass/mass for each element were 0,06 mg/kg for arsenic, 0,01 mg/kg for cadmium, 0,20 mg/kg for lead, 0,05 mg/kg for chromium and 0,15 mg/kg nickel. Recovery values ranging from 93 % to 103 % were obtained. In what concerns repeatability coefficients of variation lower than 10 % were achieved, and for the relative mean amplitude intermediate precision, values below 10% were obtained. Accuracy was evaluated using certified reference materials and *z-score* values below 2 were always obtained. The uncertainty is 8% for arsenic, cadmium and lead, 16% for lead and 7% For chromium.

The results obtained in the validation parameters allowed to conclude that the method is validated.

Keywords: Metals in Food; Inductively coupled plasma-mass spectrometry; Multielement Analysis; Validation of Analytical Methods

Capítulo 1

Introdução

1 - Introdução

A ingestão de alimentos é algo crucial para a sobrevivência humana. Como tal é imprescindível garantir a qualidade destes, qualidade essa que pode ser avaliada através de uma análise cuidada dos alimentos.

Os alimentos podem representar riscos para a saúde caso estejam contaminados, sendo os metais uma das possíveis fontes de contaminação. Alguns dos metais existentes são altamente tóxicos, mesmo que ingeridos em pequenas quantidades. O controlo da contaminação de géneros alimentícios (e.g. produtos agrícolas, produtos de pesca e pecuária, outras matérias primas e de produtos processados) por metais é por isso fundamental para minimizar a exposição a este tipo de contaminantes. Esta necessidade de controlo pode surgir quer da parte da indústria alimentar, quer de outros elos da cadeia económica que pretendam verificar a conformidade dos produtos que adquirem

Assim sendo, este trabalho foca-se no desenvolvimento de uma metodologia de espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) para análise dos elementos arsénio, cádmio, chumbo, crómio e níquel, considerados pela Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA) como sendo os mais tóxicos [1].

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório ALS Controlvet, de acordo com as necessidades do mesmo. Para além do trabalho aqui desenvolvido foram adquiridos outros conhecimentos, como os indicados no Anexo I.

1.1 Elementos metálicos em alimentos

Os alimentos são materiais essenciais à sobrevivência humana, que necessitamos de consumir diariamente, nas suas formas naturais, cozinhadas ou processadas. Como tal, a análise de alimentos é extremamente importante, pois permite avaliar as condições em que

estes se encontram, o seu valor nutricional e efetuar a monitorização dos contaminantes tóxicos que possam estar presentes, prevenindo a ocorrência de intoxicações alimentares [2].

É nos alimentos que se encontra a principal fonte de nutrientes essenciais ao organismo, maioritariamente proteínas, hidratos de carbono e lípidos, bem como certas substâncias químicas, também elas essenciais, como nutrientes minerais, e vitaminas. Como tal, é crucial que seja efetuada uma análise química rigorosa de forma a preservar a saúde, pois a falta ou o excesso de algum nutriente pode causar graves problemas [3].

É conhecido que a maioria dos nutrientes minerais incluem elementos metálicos, e que apesar de alguns destes elementos serem considerados essenciais, quando absorvidos pelo organismo em concentrações acima de certos limites, podem tornar-se tóxicos. Alguns elementos metálicos não são considerados essenciais, e quando ingeridos, mesmo em concentrações bastantes baixas, causam intoxicações [2],[4].

A toxicidade destes metais é justificada pelo facto de serem bastante reativos e consequentemente interagirem com os sistemas biológicos [5]. Os metais tóxicos têm a capacidade de competir com os metais essenciais nas funções enzimáticas que estes desempenham, bem como de interagir em locais importantes, como os grupos -SH de sistemas enzimáticos podendo provocar a sua inibição [6]. Estes metais podem agir como mimetizadores de metais essenciais, ligando-se a locais que estão naturalmente reservados a estes últimos. Dois exemplos típicos são o cádmio e o níquel, que têm a capacidade de mimetizar o zinco, um metal essencial. Muitos destes metais apresentam ainda propriedades carcinogénicas. Isto deve-se ao facto de conseguirem provocar modificações oxidativas de biomoléculas, como o ADN, devido à capacidade que apresentam de agir como centros catalíticos para reações de oxirredução com o oxigénio molecular ou outros oxidantes endógenos [6].

Estes elementos potencialmente tóxicos podem ser incorporados no alimento nas várias etapas pelas quais este passa até ser ingerido pelo ser humano, como a produção, a colheita, o processamento, o empacotamento, o transporte, a comercialização e por fim o consumo [7]. Podem também chegar aos alimentos através da sua bioacumulação ao longo da cadeia alimentar, que pode ocorrer devido a diversos fatores [8]. Fenómenos da natureza, como a chuva e o vento, podem provocar a erosão das rochas e minérios, libertando materiais contendo os elementos metálicos que, posteriormente, podem ser transportados e depositados no solo, no ar ou na água, onde podem interagir com o ecossistema envolvente e ser absorvidos pelas espécies existentes, tanto animais como vegetais, e consequentemente iniciar um ciclo de contaminação na cadeia alimentar. A atividade industrial contribui

também para a distribuição dos metais pelo meio ambiente, assim como a utilização de determinados fertilizantes que podem conter metais indesejáveis na sua composição [5],[6].

De forma a prevenir que ocorram contaminações alimentares provocadas por estes elementos, podem ser tomadas certas medidas, como garantir o controlo de qualidade dos alimentos, determinar quais as fontes de contaminação e aplicar legislação que permita controlar os níveis de contaminantes existentes nos alimentos [3],[9].

1.2 Legislação

Os Estados-membros da União Europeia têm estabelecidos programas que permitem controlar a qualidade dos géneros alimentícios bem como verificar se estes respeitam os requisitos da lei em vigor.

O documento jurídico que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios é o Regulamento (CE) N° 1881/2006 da Comissão Europeia, de 19 de dezembro de 2006 [10]. Este regulamento tem como finalidade proteger a saúde pública e como tal apresenta informação relativa aos níveis a que os contaminantes podem estar presentes, de forma a poderem ser aceites do ponto de vista toxicológico. É também referido, que nos casos dos contaminantes considerados cancerígenos ou em que certos grupos da população estejam expostos a doses superiores às admissíveis, se devem definir os teores máximos de forma a serem tão baixos quanto o razoavelmente possível.

Na secção 3 dos anexos presentes no regulamento, encontram-se fixados os teores máximos em mg/kg de cádmio e chumbo admissíveis em diversos géneros alimentícios [10].

Atualmente, encontra-se em vigor para os teores máximos de cádmio presentes em alimentos, o Regulamento N° 488/2014 da Comissão Europeia de 12 de maio de 2014, que altera o Regulamento (CE) N° 1881/2006 estabelecendo novos teores máximos deste elemento metálico, tendo em conta desenvolvimentos recentes [11].

Encontra-se também em vigor o Regulamento (UE) 2015/1006 da Comissão Europeia de 25 de junho de 2015 que altera o Regulamento (CE) 1881/2006 no que diz respeito aos teores máximos de arsénio na forma inorgânica nos géneros alimentícios [12].

1.3 Arsénio

O arsénio é um semimetal que é encontrado no meio ambiente como resultado de ocorrência natural ou da atividade humana. A principal fonte de exposição para a população

é a alimentação, especialmente através de alimentos como cereais e produtos à base de cereais, algas, arroz e produtos à base de arroz, peixe e vegetais [13],[14].

O arroz e produtos à base de arroz são precisamente os únicos tipos de produtos para os quais o Regulamento (EU) 2015/1006 estabelece limites máximos de arsénio, que se apresentam na Tabela 1.1. [12]. Este regulamento estabelece limites máximos para o arsénio na forma inorgânica pois estas formas são mais tóxicas que as formas orgânicas. No entanto, face à menor disseminação de técnicas capazes de efetuar a monitorização de teores de espécies de arsénio, o Regulamento (EU) 2016/582 define que, para efeitos de rastreio para o controlo dos teores de arsénio na forma inorgânica, os métodos de análise existentes para o arsénio total demonstram-se apropriados, pois se o valor obtido para o arsénio total for inferior ao teor máximo estabelecido para o arsénio inorgânico, a amostra é considerada conforme de acordo com os valores regulamentados [15].

Este semimetal foi considerado pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Cancro (IARC) como agente cancerígeno e a ingestão prolongada pode provocar efeitos graves no ser humano, sendo os mais frequentes as lesões cutâneas, cancro da bexiga, pulmão e pele, neurotoxicidade, doenças cardiovasculares e um metabolismo anormal da glicose [16].

A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) em parceria com a Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu para o arsénio um valor de ingestão semanal tolerável provisório (PTWI) de 15µg/kg de peso corporal. Contudo, dados mais recentes afirmam que exposições a doses mais pequenas de arsénio estão relacionadas com casos de cancro do pulmão, da pele e da bexiga, e como tal este valor deixou de ser apropriado e novas avaliações com dados mais recentes estão a ser efetuadas [13],[17].

Tabela 1.1 - Teores máximos de arsénio na forma inorgânica admissíveis em géneros alimentícios [12]

Géneros alimentícios	Teores máximos de arsénio (mg/kg)
Arroz branqueado não estufado (arroz polido ou branco)	0,20
Arroz estufado e arroz descascado	0,25
<i>Waffles</i> de arroz, <i>wafers</i> de arroz, biscoitos de arroz e bolos de arroz	0,30
Arroz para a produção de alimentos destinados a lactentes e crianças jovens	0,10

1.4 Cádmio

A alimentação é a principal fonte de exposição ao cádmio para a população não fumadora. Este metal pode sofrer bioacumulação em plantas e animais, acabando por entrar na cadeia alimentar e acumular-se no organismo, especialmente nos rins, fígado e ossos, órgãos onde o cádmio exerce maior toxicidade aquando de uma exposição a longo prazo [18]. Para além destes efeitos, o cádmio foi também considerado como agente cancerígeno pela IARC [16].

A EFSA, em 2009, estabeleceu para este metal uma ingestão semanal tolerável (TWI) de 2,5µg/kg de peso corporal. Em 2010 este valor foi reavaliado por uma comitiva constituída por elementos da FAO e da OMS e acabou por ser mantido, de forma a garantir a proteção da população em geral, mas em especial de subgrupos que podem estar mais expostos, as crianças, os vegetarianos e pessoas que vivem em áreas contaminadas [19],[20].

Na Tabela 1.2 apresentam-se os teores máximos de cádmio em alimentos, fixados pela União Europeia, segundo o regulamento N° 488/2014 da Comissão Europeia de 12 de maio de 2014 [11].

Tabela 1.2 - Teores máximos de cádmio admissíveis em géneros alimentícios [11]

Géneros alimentícios	Teores máximos de cádmio (mg/kg)
Produtos hortícolas e frutos, com exceção de raízes e tubérculos, produtos hortícolas de folha, plantas aromáticas frescas, couves de folha, produtos hortícolas de caule, cogumelos e algas	0,050
Raízes e tubérculos (exceto aipo-rábano, pastinagas, salsifis e rábanos), produtos hortícolas de caule (com exceção de aipos).	0.10
Produtos hortícolas de folha, plantas aromáticas frescas, couves de folha, aipos, aipo-rábano, pastinagas, salsifis e os seguintes cogumelos: <i>Agaricus bisporus</i> (cogumelo comum), <i>Pleurotus ostreatus</i> (pleuroto) e <i>Lentinula edodes</i> (“shiitake”)	0.20
Cogumelos, com exceção dos referidos anteriormente	1.0
Grãos de cereais, com exceção de trigo e arroz	0.10
Grãos de trigo, grãos de arroz e grãos de soja	0.20
Carne (com exceção de miudezas) de bovino, ovino, suíno e aves de capoeira	0.050
Carne de cavalo, com exceção de miudezas	0.20
Fígado de bovino, ovino, suíno, aves de capoeira e cavalo	0,50
Rim de bovino, ovino, suíno, aves de capoeira e cavalo	1.0
Parte comestível do peixe, com exceção das espécies referidas em outros pontos	0.050
Parte comestível dos seguintes peixes: carapau (espécie <i>Scomber</i>), atum (espécies <i>Thunnus</i> , <i>Katsuwonus pelamis</i> , <i>Euthynnus</i>) e <i>Sicyopterus lagocephalus</i>	0.10
Parte comestível dos seguintes peixes: judeu (espécie <i>Auxis</i>)	0.15
Parte comestível dos seguintes peixes: biqueirão (espécie <i>Engraulis</i>) espadarte (<i>Xiphias gladius</i>) sardinha (<i>Sardina pilchardus</i>)	0.25
Crustáceos: músculo dos apêndices e do abdómen. No caso dos caranguejos e crustáceos similares (<i>Brachyura</i> e <i>Anomura</i>), a parte comestível dos apêndices	0.50
Moluscos bivalves	1.0
Cefalópodes (sem vísceras)	1.0
Fórmulas para lactentes e fórmulas de transição	
— Fórmulas em pó fabricadas a partir de proteínas ou hidrolisados de proteínas do leite de vaca	0,010
— Fórmulas líquidas fabricadas a partir de proteínas ou hidrolisados de proteínas do leite de vaca	0,005 0,020
— Fórmulas em pó fabricadas a partir de isolados de proteína de soja ou de uma mistura destes com proteínas do leite de vaca	0,010
— Fórmulas líquidas fabricadas a partir de isolados de proteína de soja ou de uma mistura destes com proteínas do leite de vaca	
Alimentos à base de cereais transformados e alimentos para bebés destinados a lactentes e crianças jovens	0,040
Suplementos alimentares, com exceção dos referidos no ponto seguinte	1.0
Suplementos alimentares que consistam exclusiva ou principalmente em algas secas, produtos derivados de algas ou moluscos bivalves secos	3.0

1.5 Crómio

O crómio é um metal que ocorre naturalmente, surgindo em rochas, no solo e em gases vulcânicos. Este elemento metálico pode existir em diferentes estados de oxidação, predominando os estados trivalente Cr(III) e os hexavalente Cr(VI). O Cr(III) é a forma que está presente em diversos alimentos, especialmente em vegetais e é considerado um nutriente essencial pois auxilia no metabolismo normal da glicose e de certas proteínas. O Cr(VI) surge normalmente devido a processos industriais e pode estar presente na água potável que pode ser utilizada para confeccionar certos alimentos, como café, infusões, sopas e alimentos secos para bebés, duplicando a exposição ao Cr(VI).

Especialistas da EFSA, após vários estudos efetuados, estabeleceram para o Cr(III) um valor de ingestão diária tolerável (TDI) de 0,3 mg/kg de peso corporal, valor que não suscita preocupações para a saúde pública, pois a exposição a este metal em todas as faixas etárias está abaixo deste valor [21].

Porém, a utilização de água que pode conter Cr(VI) na preparação de determinados alimentos levanta preocupações pois a IARC classificou os compostos com Cr(VI) como cancerígenos para os seres humanos, com relação particular com o cancro dos pulmões. Contudo a EFSA ainda não tem dados suficientemente confiáveis que permitam quantificar o valor máximo admissível de Cr(VI) nos alimentos [16].

1.6 Chumbo

O chumbo é um metal que ocorre naturalmente no ambiente e através de atividades humanas, como a mineração e atividade industrial. Os seres humanos estão expostos ao chumbo através da água, solo, poeiras e alimentação, sendo esta última a principal fonte de exposição, nomeadamente através de alimentos como os cereais e legumes.

O chumbo é considerado tóxico para os seres humanos, sendo o principal alvo o sistema nervoso central. Pode também afetar as funções cognitivas e ter efeitos negativos a nível cardiovascular quando se trata de crianças. Este metal é ainda considerado pela IARC como provavelmente cancerígeno para os seres humanos [16].

Especialistas da FAO e da OMS estabeleceram um valor de ingestão semanal tolerável provisório (PTWI) de 25 µg/kg de peso corporal. Contudo a EFSA considera que este valor já não é apropriado e impera a necessidade de calcular novas margens de exposição a este metal [22].

Na Tabela 1.3 apresentam-se os teores máximos de chumbo em alimentos fixados pela União Europeia, segundo o regulamento N° 1881/2006 da Comissão Europeia, de 19 de dezembro de 2006 [10].

Tabela 1.3 – Exemplos de teores máximos de chumbo admissíveis em géneros alimentícios [10]

Géneros alimentícios	Teores máximos de chumbo (mg/kg)
Leite cru, leite tratado termicamente e leite para fabrico de produtos lácteos	0,020
Fórmulas para lactentes e fórmulas de transição	
- Comercializadas em forma de pó	0,050
- Comercializadas em forma líquida	0,010
Carne (com exceção de miudezas) de bovino, ovino, suíno e aves de capoeira	0,10
Miudezas de bovino, ovino, suíno e aves de capoeira	0,50
Parte comestível do peixe	0,30
Crustáceos	0,50
Moluscos e bivalves	1,50
Cefalópodes	0,30
Cereais e leguminosas	0,20
Produtos hortícolas, com exceção de couves de folha, salsifis, produtos hortícolas de folha e plantas aromáticas frescas, cogumelos, algas e frutos hortícolas	0,10
Couves de folha, salsifis, produtos hortícolas de folha excluindo ervas aromáticas frescas e os seguintes cogumelos: <i>Agaricus bisporus</i> (cogumelo comum), <i>Pleurotus ostreatus</i> (pleuroto), <i>Lentinula edodes</i> («shiitake»)	0,30
Frutos, com exceção de bagas e frutos pequenos	0,10
Bagas e frutos pequenos	0,20
Óleos e gorduras, incluindo a matéria gorda do leite	0,10
Sumos de frutos, sumos de frutos concentrados reconstituídos e néctares de frutos	
- Exclusivamente de bagas e outros frutos pequenos	0,05
- De frutos com exceção de bagas e outros frutos pequenos	0,03
Vinho (incluindo vinho espumante, com exceção do vinho licoroso), sidra, perada e vinho de frutos	0,15
- Produtos provenientes das colheitas de frutos a partir de 2016	
Vinho aromatizado, bebidas aromatizadas à base de vinho e cocktails aromatizados de produtos vitivinícolas	0,15
- Produtos provenientes das colheitas de frutos a partir de 2016	

1.7 Níquel

O níquel é um metal que ocorre naturalmente, e a sua presença em alimentos, com principal incidência nos vegetais, surge tanto por fatores naturais como resultado de atividades humanas, geralmente por fontes industriais e tecnológicas.

A exposição ao níquel pode provocar reações alérgicas e efeitos nos sistemas gastrointestinal, neurológico, hematológico e imunológico. Para além disto, o níquel foi ainda considerado pela IARC como agente cancerígeno, podendo causar cancro do pulmão e da cavidade nasal [16].

Depois de concluídos os estudos realizados pela EFSA, foi estabelecido um valor de ingestão diária tolerável (TDI) de 2,8 µg/kg de peso corporal. Este valor levou a EFSA a concluir que a atual exposição dietética ao níquel é preocupante para a população em geral, pois normalmente os valores de exposição são superiores.

Apesar das preocupações existentes atualmente devido à exposição a este metal, ainda não existem na União Europeia valores máximos para a concentração de níquel nos alimentos [23].

1.8 ALS Controlvet

A ALS Controlvet iniciou a sua atividade em março de 1999 como Controlvet Segurança Alimentar, e integra desde 2015 o grupo ALS, líder global no fornecimento de serviços técnicos e de análises laboratoriais.

A ALS Controlvet é uma empresa que apresenta como missão a contínua promoção da segurança alimentar e proteção ambiental como base de bem-estar e progresso de toda a envolvente. A empresa encontra-se situada na zona industrial de Tondela, Viseu e as suas instalações podem ser observadas na Figura 1.1.

Esta empresa conta com uma equipa de especialistas nas mais diversas áreas do setor alimentar e ambiental, garantindo assim a qualidade dos serviços prestados, baseados na competência da mesma à qual se juntam a adequação dos métodos utilizados e a contínua atualização de procedimentos e equipamentos.

O crescimento da ALS Controlvet ao longo dos anos é notório, e tem sido baseado na solidez empresarial que apresenta, bem como na capacidade de gerar relações de confiança com os seus clientes.

Atualmente a ALS Controlvet integra a vasta rede de laboratórios acreditados pelo Instituto Português de Acreditação (IPAC) e possui mais de 200 métodos de ensaio acreditados [24].



Figura 1.1- Instalações da ALS Controlvet

Capítulo 2

**Espetrometria de massa com
plasma acoplado indutivamente
(ICP-MS)**

2 - Espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS)

A determinação em alimentos dos elementos metálicos em estudo pode ser efetuada com recurso a várias técnicas, como a espectrometria de absorção atômica com câmara de grafite (GFAAS) [25-28] espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente (ICP-AES) [29-32] e espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) [33-36].

Quando se pretende escolher a técnica mais indicada a uma determinada análise, a escolha deve ter em atenção fatores como a capacidade de deteção, facilidade do uso, velocidade da análise e o custo da mesma.

As técnicas ICP-AES e ICP-MS têm a vantagem de permitir a análise simultânea de vários elementos, tornando-as vantajosas na análise de vários elementos em alimentos, em relação à técnica GFAAS, que não o permite. No que respeita à capacidade de deteção o ICP-MS e a GFAAS são vantajosas em relação à ICP-AES. Assim, pode-se afirmar, que apesar do custo elevado que apresenta, o ICP-MS é a técnica de eleição para o objetivo proposto [37].

A espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) é atualmente uma das técnicas analíticas mais sensíveis e vantajosas na análise elementar numa ampla gama de matrizes.

Esta técnica, para além de conseguir determinar concentrações na gama dos ppb, permite também analisar simultaneamente cerca de 70 elementos, bem como os isótopos individuais destes elementos que estejam presentes na amostra em análise [38],[39]. Para além de ser vantajosa devido a apresentar baixos limites de deteção para uma grande parte dos elementos, possui também um alto grau de seletividade que permite obter uma resposta única para o elemento em estudo e ainda uma razoável precisão e exatidão [40].

A Figura 2.1 mostra o modelo de ICP-MS utilizado ao longo do trabalho experimental, bem como as suas principais componentes.

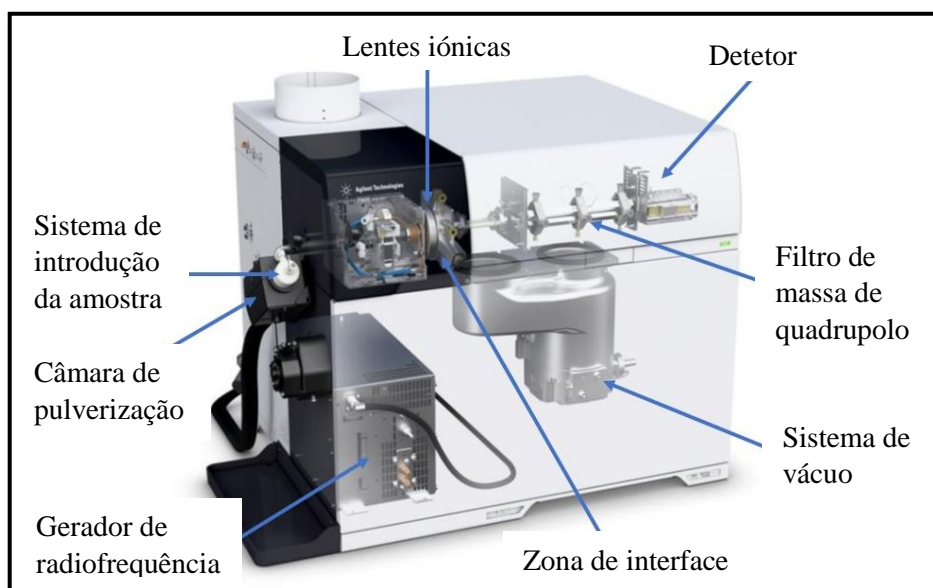


Figura 2.1 - ICP-MS Agilent 7900 e principais componentes [41]

2.1 Princípio do método

Nesta técnica, no equipamento mais vulgarizado, a introdução da amostra no plasma é feita com recurso a uma bomba peristáltica, um nebulizador e uma câmara de pulverização. A bomba peristáltica bombeia a solução em direção ao sistema de introdução de amostra, permitindo também o controlo do fluxo da solução. Seguidamente a solução da amostra passa no nebulizador, onde é convertida num aerossol com recurso a um fluxo de árgon, denominado gás de arraste.

O aerossol aqui formado passa através de uma câmara de pulverização de dupla passagem, onde as gotículas são separadas de acordo com as suas dimensões, sendo as maiores removidas através da colisão com as paredes da câmara de pulverização. O excesso de solução que se forma na câmara de pulverização é removido pelo canal de drenagem da bomba peristáltica, evitando que esta fique cheia. Este processo encontra-se representado esquematicamente na Figura 2.2 [41],[42].

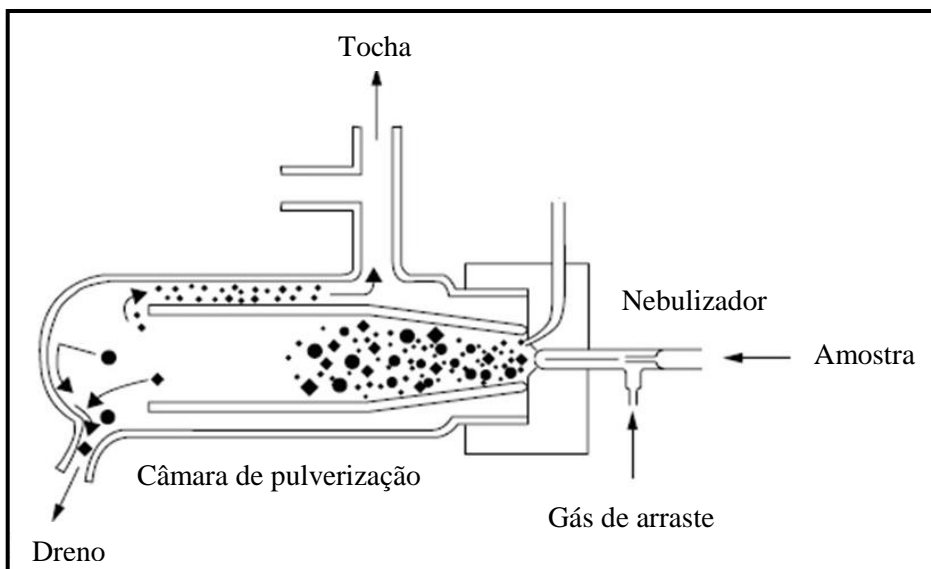


Figura 2.2 – Representação esquemática do sistema de introdução de amostra em ICP-MS utilizando a câmara de pulverização de dupla passagem e o nebulizador [41]

Nesta fase do processo é também utilizado um refrigerador, que permite arrefecer a câmara de pulverização, levando a um controlo preciso da temperatura dentro da mesma, e consequentemente à obtenção de sinal muito estável [41],[43].

O aerossol que sai da câmara de pulverização é diretamente enviado para o tubo do injetador presente na tocha. Esta é constituída por três tubos concêntricos de quartzo, pelos quais passa argon, como mostrado na Figura 2.3.

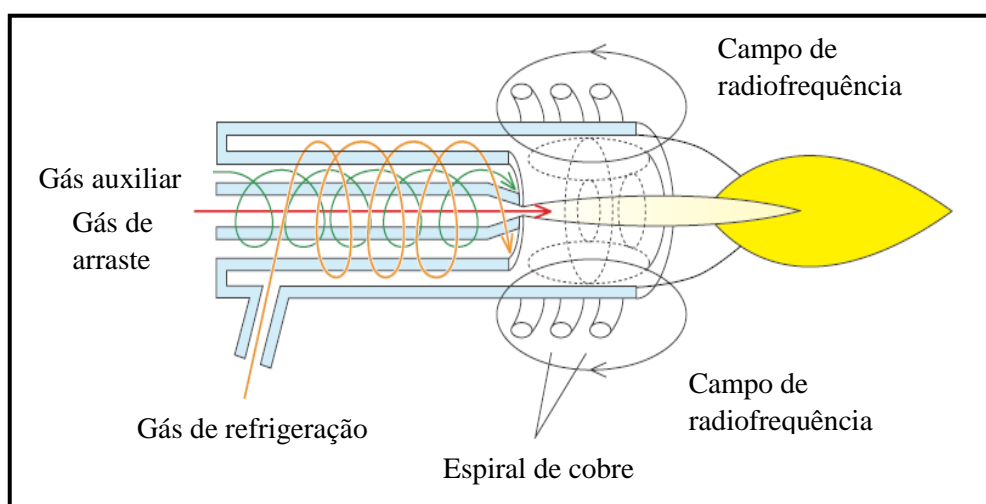


Figura 2.3 – Representação esquemática de uma tocha de ICP [41]

Na parte superior da tocha encontra-se uma espiral de cobre que é sujeita a uma radiofrequência gerando um campo eletromagnético. É devido a este campo que os elétrons

formados na ignição do plasma, provocada por uma descarga elétrica, são acelerados até colidirem com os átomos de argônio que atravessam a tocha. Como resultado destas colisões ocorre a produção de íons Ar^+ e elétrons livres.

A formação do plasma ocorre devido ao aumento do número de átomos de argônio ionizados, que são resultantes da existência de colisões adicionais.

O plasma consegue atingir temperaturas de 5000 a 10000K, tornando-se uma eficiente fonte de ionização, facilitando também o processo de evaporação do aerossol e a consequente ocorrência da dissociação, atomização, ionização e excitação dos átomos e íons. Ocorre a formação de íons do tipo M^+ [41],[42].

Após a formação de íons, dá-se a extração dos mesmos para a zona de interface, que tem como função transportar estes íons de forma eficiente até ao espectrômetro de massa. Esta zona é considerada a mais crítica de todas as partes constituintes do ICP-MS devido às diferentes pressões existentes, pois a tocha encontra-se à pressão atmosférica enquanto que o espectrômetro de massa funciona em alto vácuo, com uma pressão normalmente de 10^{-6} torr.

A interface é constituída por dois cones metálicos, denominados *sampler* e *skimmer*, como é visível na Figura 2.4. Quando chegam à zona de interface os íons formados no plasma passam pelo primeiro cone existente, o *sampler*, e seguidamente pelo *skimmer*, que apresenta dimensões mais reduzidas e um orifício também mais pequeno que o do *sampler*. Depois de passarem pelo *skimmer* os íons são, através de lentes iónicas, direcionados para o analisador de massa, onde são separados de acordo com a sua razão massa/carga [39],[42].

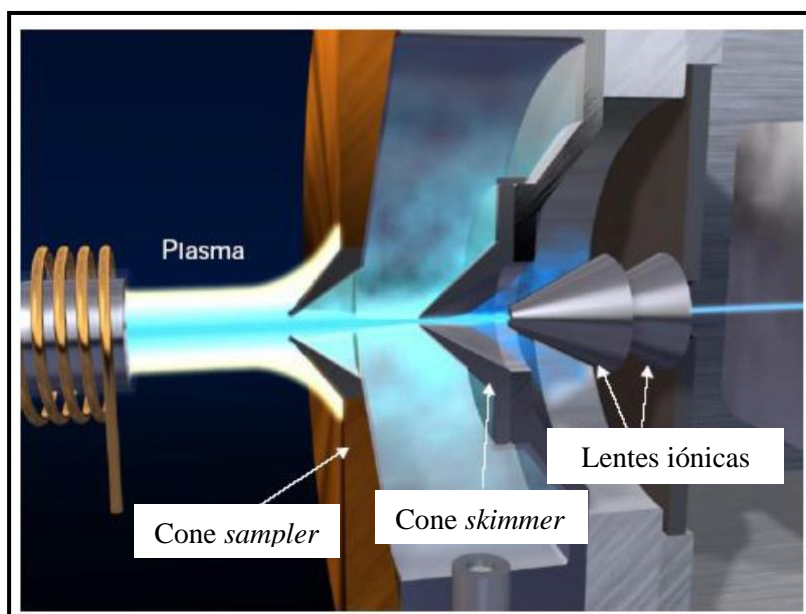


Figura 2.4 - Representação esquemática da zona de interface [41]

O analisador de massa mais comum é o de quadrupolo, representado esquematicamente na Figura 2.5. Um filtro de massa de quadrupolo é constituído por quatro hastes metálicas hiperbólicas com o mesmo comprimento e diâmetro, dispostas paralelamente. As quatro hastes funcionam como um filtro de massa onde são aplicados campos de corrente contínua e alternada em pares opostos, permitindo que para cada conjugação de campos aplicados apenas passem pelo centro do quadrupolo, iões com uma determinada razão massa/carga, atingindo seguidamente o detetor. Os iões que não tenham uma razão/massa carga de interesse são instáveis e acabam por colidir com as hastes [42].

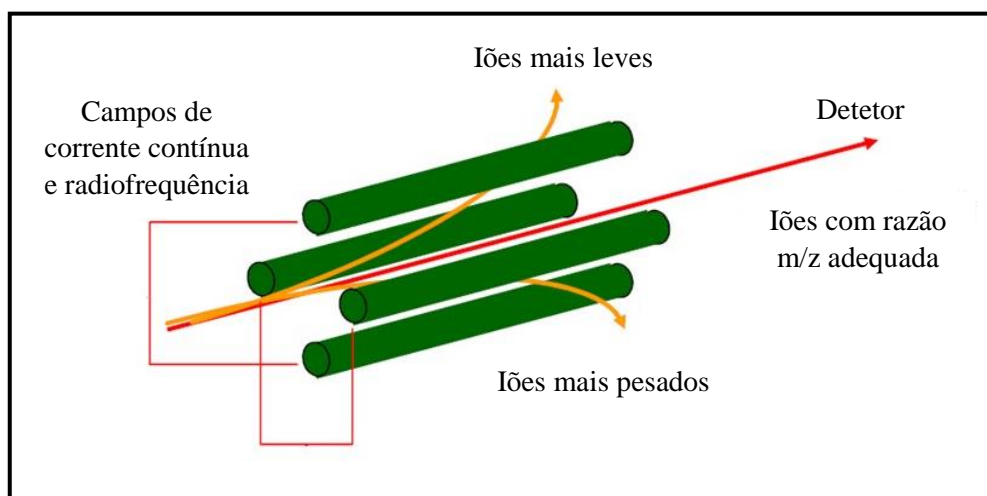


Figura 2.5 - Esquema representativo de um filtro de massa de quadrupolo [41]

Após passarem pelo filtro de massa de quadrupolo, os iões chegam ao detetor, frequentemente, do tipo multiplicador de eletrões, apresentado na Figura 2.6. O multiplicador de eletrões é constituído por diversos dínodos com tensões aplicadas sucessivamente mais positivas. Aquando da colisão dos iões com o primeiro dínodo é formada uma cascata de eletrões, que vai aumentando conforme os eletrões vão atingindo sucessivamente os vários dínodos. Depois de passarem por todos os dínodos, os eletrões atingem o coletor que determina o número de eletrões gerados para cada um dos valores de m/z, obtendo assim um sinal elétrico. Este sinal é processado informaticamente e permite determinar o teor do elemento em estudo na amostra [41],[42].

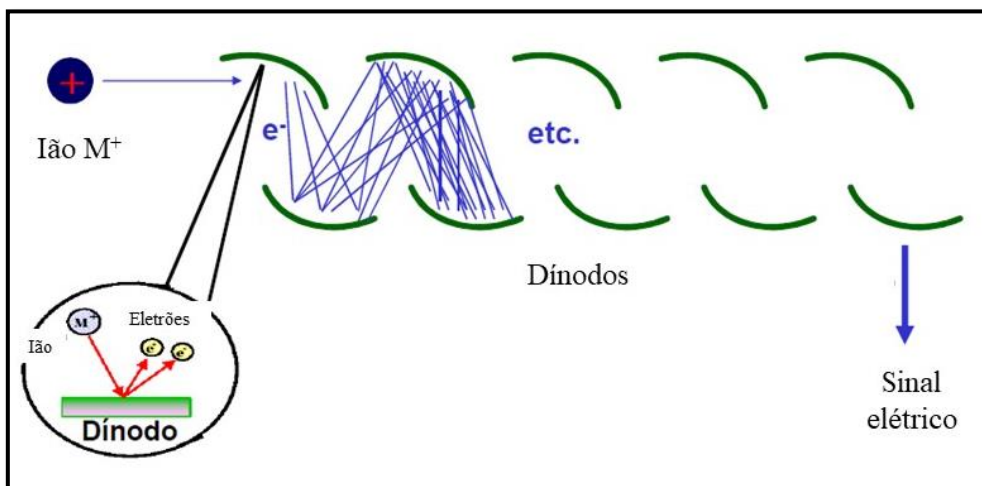


Figura 2.6 - Esquema representativo de um detector do tipo multiplicador de elétrons [41]

2.2 Interferências

As interferências são um aspecto crucial no ICP-MS, pois muitas vezes determinam as etapas de preparação da amostra, bem como a metodologia a ser utilizada numa análise. Mas, para tal ocorrer é necessário que haja um conhecimento prévio das mesmas [42].

As interferências que podem ocorrer dividem-se em duas categorias, espectrais e não espectrais.

2.2.1 Interferências espectrais

Este tipo de interferências ocorre quando um íon do analito apresenta o mesmo valor de m/z que um íon presente no plasma.

Estas interferências podem ser divididas em quatro categorias: formação de íons com dupla carga, formação de óxidos e hidróxidos, formação de isobáricas e formação de íons poliatômicos [44].

Formação de íons com dupla carga

Este fenómeno ocorre quando há formação de íons M^{++} , o que se deve essencialmente ao baixo potencial de segunda ionização que alguns elementos apresentam. Como consequência o sinal dos elementos analisados é reduzido e dá-se a formação de um falso sinal nas massas iguais a metade da massa do elemento em análise [42].

Formação de óxidos e hidróxidos

Este tipo de interferência engloba os óxidos e hidróxidos que podem ser formados pela matriz, pelo analito, pelo solvente ou pelos gases do plasma, sendo as interferências mais graves resultantes dos componentes da matriz e do analito.

Como os iões MO^+ e MOH^+ podem ser formados por um grande número de espécies, existe uma forte possibilidade de ocorrer sobreposição dos picos de um dos iões dos analitos em análise com um pico destas espécies [39],[42].

Formação de isobáricas

Este tipo de interferência ocorre devido à formação de iões com a mesma m/z , mas provenientes de isótopos de elementos diferentes.

Como é comum encontrar-se na natureza os elementos nos seus vários isótopos, torna-se então bastante frequente encontrar no espectro iões de elementos diferentes que apresentem a mesma m/z [38].

Formação de iões poliatômicos

Este é o tipo de interferência mais comum em análise de rotina e também o mais problemático. Este fenómeno ocorre no plasma, e é resultado de interações entre espécies existentes neste e espécies existentes na matriz ou mesmo provenientes da atmosfera. Consequentemente, ocorre a formação de diversos iões moleculares, que ao embaterem no detetor, o seu sinal surge como sendo de uma massa que na verdade é a soma de dois átomos provenientes das espécies anteriormente referidas [40].

O exemplo mais comum é o $^{35}Cl^{40}Ar$ que pode produzir um sinal falso para o ^{75}As [45].

2.2.1.1 Célula de colisão

A utilização de células de colisão é considerado o método preferencial para a remoção das interferências espectrais, especialmente as poliatômicas.

Este método atenua as interferências poliatômicas utilizando para tal um gás não reativo, como por exemplo hélio, e um processo denominado de discriminação de energia cinética. Este processo leva em consideração o facto de os iões poliatômicos apresentarem um tamanho superior aos outros iões que tem a mesma massa. Como consequência os iões poliatômicos colidem mais frequentemente com o hélio aquando da passagem pela célula de colisão, fazendo com que tenham uma energia residual menor. Contudo, para que a diferença

de energia residual entre os iões poliatômicos e os iões em análise seja suficientemente elevada ao ponto de conseguir que a sua separação ocorra, é necessário que ocorra um grande número de colisões, como é possível de observar na Figura 2.7 [46],[47],[48].

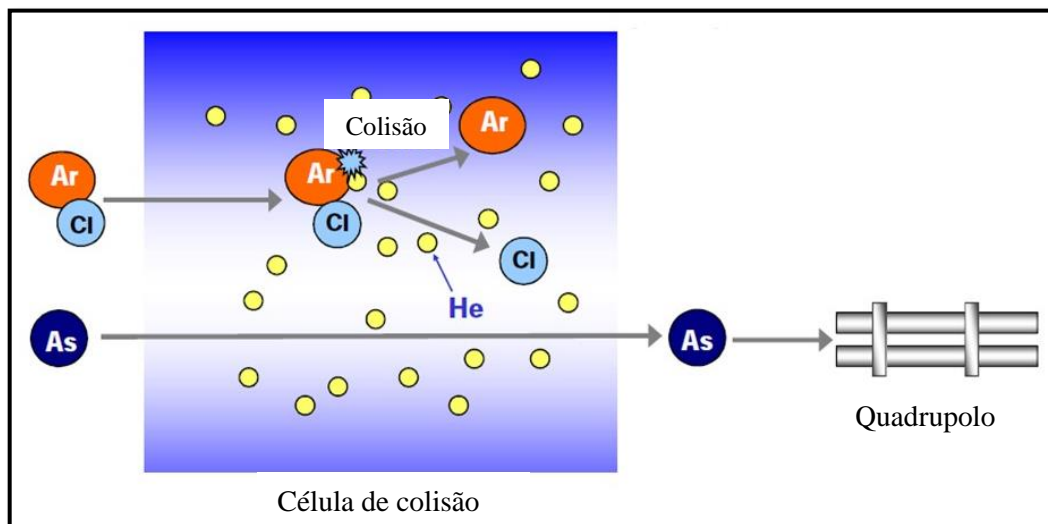


Figura 2.7 - Esquema representativo da colisão de He com a molécula $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$ na célula de colisão [41]

2.2.2 Interferências não espectrais

Este tipo de interferências também pode ser chamado de efeitos de matriz e englobam as interferências causadas por efeitos físicos, por efeitos de memória e por efeitos de carga espacial.

Efeitos físicos

Este tipo de interferência pode ocorrer devido à transmissão de iões através da região de interface, bem como aos processos de nebulização e transporte de amostras para o plasma. Estes processos podem ser afetados se ocorrerem alterações na tensão superficial e na viscosidade causadas por um determinado componente da matriz. Consequentemente, podem ocorrer mudanças na composição da matriz que originam problemas na obtenção do sinal, como a supressão do mesmo [38],[49].

Efeitos de memória

Este efeito ocorre quando na amostra em análise existe uma contribuição de isótopos dos elementos existentes na amostra analisada anteriormente. Isto ocorre quando há

deposição de amostras no sistema de introdução de amostras, nos cones existentes na interface, no plasma e na câmara de pulverização.

De forma a eliminar este efeito é necessário que o período de lavagem entre amostras seja suficientemente longo [38],[49].

Efeitos de carga espacial

O efeito de carga espacial ocorre na zona de interface, mais especificamente entre o *skimmer* e as lentes iónicas, e deve-se à repulsão eletrostática existente nessa região. Este efeito é mais notado quanto maior for a massa atómica do interferente e menor a massa atómica do analito.

Este efeito provoca um desvio na trajetória dos iões mais leves, alterando a eficiência da transmissão destes para o analisador de massas.

A maneira mais comum de tentar reduzir este efeito é aplicando tensões nas lentes iónicas, de forma a tentar orientar eficientemente os iões do analito para o analisador de massas [42].

2.2.2.1 Padrão interno

A utilização de um padrão interno é muito útil para corrigir as interferências físicas. Para que a correção seja efetiva, é necessário que o padrão interno seja o mais possível semelhante ao analito, de forma a que ambos sejam afetados de forma idêntica pelas mudanças da matriz [38],[49].

O método do padrão interno consiste na adição de uma quantidade constante de um ou mais elementos escolhidos a todas as amostras, brancos e padrões de calibração a serem usados numa análise. O padrão interno deve respeitar determinadas condições. Como tal, é necessário que apresente propriedades químicas e físicas análogas às do analito e que apenas esteja presente nas amostras numa quantidade que não influencie o sinal obtido. É ainda necessário que tanto o analito como o padrão interno sejam influenciados na mesma proporção pelos erros existentes [39].

Capítulo 3

Validação de métodos analíticos

3 - Validação de métodos analíticos

Para ser possível dar um resultado como válido é necessário que este satisfaça certos requisitos de qualidade que são exigidos [50].

O laboratório pode desenvolver um novo método de ensaio ou procurar métodos normalizados que apresentem características adequadas ao objetivo do laboratório. Os métodos normalizados são métodos que já foram convenientemente validados e são aceites pela comunidade laboratorial, estando sempre sujeitos a uma atualização periódica. Apesar de já serem validados, quando um laboratório adota um destes métodos é necessário que todos os parâmetros essenciais de validação sejam verificados de forma a confirmar a adequabilidade aos fins pretendidos pelo laboratório e continuar até satisfazer os requisitos exigidos [51].

Todo este processo, que engloba a verificação da adequabilidade do método e a verificação das suas características de desempenho, constitui a validação do método.

3.1 Parâmetros de validação

Os requisitos mínimos para a validação de um método analítico incluem os seguintes parâmetros: gama de trabalho e linearidade, limiares analíticos, seletividade e especificidade, precisão, exatidão e incertezas [51],[52].

3.1.1 Gama de trabalho / Linearidade

Para qualquer método é necessário começar por estabelecer a gama de concentrações do analito para as quais este pode ser aplicado. Esta gama é definida como um intervalo entre a menor e maior concentração de um analito numa determinada amostra, onde foi

comprovado que a sensibilidade permanece constante e o método apresenta níveis de precisão, exatidão e linearidade adequados.

A análise da gama de trabalho pode tornar-se desnecessária quando esta está referenciada em bibliografia reconhecida. Contudo, em rotina é sempre necessário analisar a linearidade da curva de calibração através da representação gráfica desta, juntamente com a análise do coeficiente de correlação. Em análise química, o coeficiente de correlação deve ter um valor superior a 0,995 [51].

3.1.2 Limiares analíticos

O cálculo do limite de deteção (LD) e do limite de quantificação (LQ) tem elevada importância, pois permite traçar os limiares analíticos que é possível alcançar com o método que se pretende utilizar.

O limite de deteção (LD) é definido como a menor quantidade de analito presente numa amostra que pode ser detetada com uma determinada certeza estatística. Ou seja, o LD corresponde à mais pequena quantidade de analito numa amostra que pode ser detetada, mas não obrigatoriamente quantificada com um rigor pré-definido.

Este valor pode ser calculado com base na equação 3.1, onde X_0 representa a média dos valores medidos para uma série de brancos, normalmente 10 determinações independentes, e S_0 representa o desvio padrão associado a X_0 . O fator 3,3 é estabelecido para um nível de confiança de cerca de 99,7%.

$$LD = X_0 + 3.3S_0 \quad (3.1)$$

O limite de quantificação (LQ) corresponde à menor concentração medida a partir da qual é possível quantificar o analito, com uma determinada exatidão e precisão. Normalmente, a nível prático, corresponde ao padrão de calibração de menor concentração.

Este valor pode ser calculado com base na equação 3.2, onde X_0 representa a média dos valores medidos para uma série de brancos, normalmente 10 determinações independentes, e S_0 representa o desvio padrão associado a X_0 [51].

$$LQ = X_0 + 10S_0 \quad (3.2)$$

3.1.3 Seletividade e especificidade

É de elevada importância garantir que o sinal que se obtém para um determinado analito se deve apenas a esse analito e não à presença de interferentes. Para tal, é necessário garantir que o método é seletivo e específico.

A seletividade é a capacidade que o método apresenta de identificar e distinguir um analito em misturas complexas, sem a ocorrência de interferência de outros componentes.

A especificidade ocorre quando o método tem a capacidade de discriminar o analito relativamente a outras substâncias, isto é, assegura que a grandeza medida resulta apenas do analito em estudo [53].

Assim sendo, um método é considerado específico e seletivo quando a realização de testes de recuperação resulta em taxas de recuperação próximas de 100% [51].

A percentagem de recuperação de uma amostra é calculada através da expressão 3.3:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{(C_{\text{amostra fortificada}} - C_{\text{amostra}})}{C_{\text{esperada}}} \times 100 \quad (3.3)$$

3.1.4 Precisão

A precisão avalia a dispersão de resultados entre ensaios independentes, que são, em condições definidas, repetidos sobre uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, permitindo assim avaliar a capacidade que o método apresenta de repetir e reproduzir os resultados obtidos para uma mesma amostra ou padrão. Esta pode ser avaliada através da repetibilidade, da reprodutibilidade e da precisão intermédia [54].

A repetibilidade expressa a precisão de um método efetuado em condições idênticas e num curto intervalo de tempo, sendo que estas condições devem ser mantidas tão estáveis quanto possível. Alguns exemplos dessas condições são: mesmo laboratório, mesmo analista, mesmo equipamento e mesmos reagentes.

A repetibilidade pode ser determinada através de ensaios intralaboratoriais, sendo necessária a realização de pelo menos 10 ensaios sobre a mesma amostra ou padrões. Através de ensaios interlaboratoriais, em que são alteradas todas as condições de medida é avaliada a denominada reprodutibilidade.

A diferença absoluta obtida entre dois ensaios efetuados em condições de repetibilidade deve manter-se abaixo do limite de repetibilidade (r), determinado para um nível de confiança de 95% [51].

O limite de repetibilidade, para um nível de confiança de 95%, é obtido segundo a equação 3.4, onde, 2,8 é um valor tabelado de t de *student* e S_{ri} representa o desvio padrão da repetibilidade associada aos resultados obtidos.

$$r = 2,8 \sqrt{S_{ri}^2} \quad (3.4)$$

É também importante considerar o coeficiente de variação da repetibilidade (CV_r), que é calculado através da equação 3.5, onde \bar{x} representa a média dos valores considerados.

$$CV_r = \frac{S_{ri}}{\bar{x}} \times 100 \quad (3.5)$$

A precisão intermédia define-se como sendo uma situação intermédia entre a repetibilidade e a reprodutibilidade, sendo também considerada a medida de precisão que melhor representa a variabilidade dos resultados obtidos num laboratório.

A precisão intermédia é avaliada através da realização de ensaios intralaboratoriais, utilizando o mesmo método sobre a mesma amostra ou padrão, tendo sempre em atenção que é necessário definir qual a condição ou condições que se pretendem variar, sendo que estas podem ser as épocas em que efetuam as análises, o equipamento utilizado ou o analista [51].

3.1.5 Exatidão

A exatidão de um método permite avaliar a concordância entre o valor obtido num ensaio e o valor de referência aceite como verdadeiro.

A exatidão de um método pode ser avaliada através dos seguintes processos: materiais de referência certificados (MRC), ensaios interlaboratoriais (EIL) e testes comparativos.

Os MRC, sempre que possível, devem ser usados pelos laboratórios na validação de um método, visto serem considerados uma ferramenta importante de validação e controlo de qualidade. Estes materiais apresentam um valor de concentração bem definido, bem como uma incerteza associada ao mesmo.

A avaliação dos resultados obtidos através da análise de MRC pode ser feita através de vários critérios, como o erro relativo ou o fator de desempenho, denominado *Z-score*.

Outra forma de avaliar a exatidão é através de EIL, mais precisamente ensaios interlaboratoriais de aptidão que permitem avaliar o desempenho dos laboratórios participantes.

A avaliação do desempenho do laboratório é normalmente feita determinando o *Z-score*. Este é determinado pela equação 3.6, onde o X_{lab} representa o valor obtido pelo laboratório, o X_v o valor aceite como verdadeiro e o S o desvio padrão da média obtida pelos laboratórios participantes no EIL (após rejeição de *outliers*).

$$Z = \frac{(X_{lab} - X_v)}{S} \quad (3.6)$$

O desempenho dos laboratórios participantes é avaliado segundo a seguinte escala de pontuação:

$|Z| \leq 2 \rightarrow$ Satisfatório

$2 < |Z| \leq 3 \rightarrow$ Questionável

$|Z| > 3 \rightarrow$ Incorreto

Os ensaios de recuperação também podem ser considerados como uma ferramenta de avaliação da exatidão. Contudo os resultados destes ensaios devem ser interpretados com precaução pois a eficiência da extração não é amplamente avaliada [51].

3.1.6 Incertezas

A incerteza define-se como sendo um parâmetro associado ao resultado de uma medição, que permite caracterizar a dispersão de valores que podem ser atribuídos à medida ou grandeza em avaliação [55].

Existem várias abordagens que podem ser utilizadas para determinar as incertezas de medição, sendo que as mais comuns são: abordagem passo a passo, abordagem baseada em informação interlaboratorial e abordagem baseada em dados da validação e/ou do controlo de qualidade do método analítico.

Atualmente, é a última abordagem mencionada é a mais utilizada para a determinação das incertezas. Contudo qualquer uma destas abordagens pode ser usada pelo laboratório, desde que se confirme que são adequadas para o método em estudo [56].

Quando se aborda o cálculo das incertezas há dois parâmetros essenciais que devem ser mencionados no cálculo destas, a precisão e a exatidão.

A componente da incerteza associada à precisão dos resultados, é calculada a partir da amplitude média dos resultados obtidos para várias amostras analisadas em duplicado, e é calculada a partir da seguinte equação:

$$u_{precisão} = \frac{\bar{A}}{1,128} \quad (3.7)$$

Em que, \bar{A} representa a amplitude média dos duplicados e 1,128 é um valor tabelado para um número de réplicas igual a 2.

A componente da incerteza associada à exatidão dos resultados pode ser determinada utilizando MRC, EIL ou ensaios de recuperação. Esta componente é calculada através da equação 3.8 e 3.9, em que, n representa o número de ensaios efetuados e $bias$ a diferença entre o valor obtido experimentalmente e o valor de referência [57].

$$u(bias) = \sqrt{RMS_{bias}^2 + u(Cref)^2} \quad (3.8)$$

Onde,

$$RMS_{bias} = \sqrt{\frac{\sum(bias_i)^2}{n}} \quad (3.9)$$

Depois de determinadas as incertezas associadas à precisão e à exatidão é necessário calcular a incerteza combinada, calculada pela seguinte expressão: [34]

$$u_{combinada} = \sqrt{u_{precisão}^2 + u_{exatidão}^2} \quad (3.10)$$

Para o cálculo da incerteza expandida considera-se um fator de expansão $k = 2$ a um nível de confiança de 95%.

$$U_{expandida} = k \times u_{combinada} \quad (3.1)$$

Capítulo 4

Parte experimental

4 – Parte Experimental

Nesta secção são apresentados todos os componentes necessários à realização do trabalho experimental, que incluem equipamento, material, reagentes, padrões e gases. São também apresentados os procedimentos de preparação das amostras e dos padrões utilizados ao longo do trabalho.

4.1 Equipamentos

- ✓ ICP-MS Agilent 7900 (Figura 4.1);
- ✓ Autosampler SPS 4;
- ✓ ISIS 3 - Integrated Sample Introduction System;
- ✓ Unidade de arrefecimento;
- ✓ Bomba de vácuo;
- ✓ DigiPREP MS da marca SCP Science;
- ✓ Purificador de ácidos da Marca Savillex DST-1000;
- ✓ Balança analítica.



Figura 4.1 - Fotografia do ICP-MS Agilent 7900 utilizado na realização do trabalho experimental

4.2 Material

Todo o material utilizado ao longo do trabalho deve estar livre de contaminantes. Como tal, antes de ser utilizado o material é descontaminado com uma solução de HNO₃ purificado 2% preparada com água bidestilada.

- ✓ Balões volumétricos de PFA – 50 ml, 100 ml;
- ✓ Tubos DigiPREP – 50 ml;
- ✓ Micropipetas – 1 ml, 5 ml;
- ✓ Tubos Falcon – 15 ml;
- ✓ Funis;
- ✓ Papel de filtro.

4.3 Gases

Para a realização do trabalho experimental utilizaram-se dois gases, o árgon 5.0 como gás de arraste e hélio para a célula de colisão.

4.4 Reagentes e padrões

- ✓ Ácido nítrico p.a. para purificação;
- ✓ Padrão individual de arsénio 1000 ppm SCP Science PlasmaCAL;
- ✓ Padrão individual de cádmio 1000 ppm SCP Science PlasmaCAL;
- ✓ Padrão individual de chumbo 1000 ppm SCP Science PlasmaCAL;
- ✓ Padrão individual de crómio 1000 ppm SCP Science PlasmaCAL;
- ✓ Padrão individual de níquel 1000 ppm SCP Science PlasmaCAL;
- ✓ Padrão multielementar 10 ppm SCP Science PlasmaCAL;
- ✓ Solução de tuning Agilent (Ce, Co, Li, Tl e Y);
- ✓ Solução de padrões internos ISC Science (Sc, Ge, Y, Rh, In, Tb, Ir);
- ✓ Água ultrapura (18,2 MΩ·cm);

4.5 Preparação de Amostras

Para a realização do trabalho experimental foi utilizada uma considerável gama de amostras, indicada na Tabela 4.1, de forma a ser representativa do tipo de amostras analisadas em rotina no laboratório.

Tabela 4.1 - Amostras utilizadas para a realização do trabalho experimental

Amostras	Descrição
Alimentares	Refeição, chá, rolinho com queijo e fiambre, iogurte líquido, cenoura, cereais, salmão, leite, requeijão, açúcar, gengibre, carne de peru, filete de pescada, aguardente, ovos de consumo
AAFCO	<i>Medicated Lamb Feed, Dairy Beef Feed, Poultry Game Bird Feed, Llama Feed, Medicated Swine Feed</i>
FAPAS	<i>Powdered Rice, Chocolate</i>

As amostras analisadas ao longo do trabalho foram preparadas por digestão em meio ácido. Para tal, coloca-se num tubo específico para a realização da digestão, uma toma de amostra de cerca de 0,25g tanto para amostras sólidas como amostras líquidas, à qual se adiciona 2 ml de ácido nítrico ultrapuro.

Seguidamente, as amostras são digeridas num digestor de vaso aberto, DigiPREP, de acordo com o programa de digestão apresentado na Tabela 4.2.

Concluída a digestão, é necessário deixar arrefecer as amostras, para proceder à aferição dos tubos até 50 ml com uma solução de HNO₃ 2%. Seguidamente, as amostras são filtradas em filtros lavados de forma a descontaminá-los. A lavagem é feita com recurso a água bidestilada e uma solução de HNO₃ 2%.

Por fim, a solução preparada é transferida para tubos Falcon de 15 ml e está pronta a analisar.

Tabela 4.2 - Programa de digestão

Fase	Temperatura (°C)	Tempo para atingir a temperatura (min)	Tempo de espera (min)
1	45	30	15
2	65	15	15
3	95	15	45

4.6 Preparação de padrões

Na preparação dos padrões da curva de calibração e dos padrões de controlo, são utilizados padrões individuais (padrões de calibração) e multielementares (padrões de controlo) dos analitos de interesse, especificamente destinados à utilização na técnica em estudo.

4.6.1 Preparação de padrões para construção da curva de calibração

A partir do padrão mãe de 1000 ppm de cada um dos analitos de interesse, prepara-se uma “solução intermédia 1”, pipetando 0,1 ml do padrão mãe de cádmio e 1 ml dos restantes padrões para um balão volumétrico de 100 ml, o qual é aferido com uma solução de HNO₃ 2%, obtendo uma solução com uma concentração de 1000 ppb para o cádmio e 10000 ppb para os restantes elementos.

A partir desta solução prepara-se uma “solução intermédia 2”, pipetando 5 ml da “solução intermédia 1” para um balão volumétrico de 50 ml, aferindo seguidamente com uma solução de HNO₃ 2%, obtendo uma solução de 100 ppb Cd e 1000 ppb dos restantes elementos.

Os padrões para construção da curva de calibração são preparados a partir das duas soluções intermédias, como indicado na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 - Preparação dos padrões para construção da curva de calibração

Nível	Concentração (cádmio/restantes)	Volume padrão / ml	Volume final / ml
L1	0 ppb / 0 ppb	50 ml sol. HNO ₃ 2%	50
L2	0,05 ppb / 0,5 ppb	0,25 ml sol. 10 ppb / 100 ppb	50
L3	0,1 ppb / 1 ppb	0,5 ml sol. 10 ppb / 100 ppb	50
L4	0,5 ppb / 5 ppb	0,25 ml sol. intermédia 2	50
L5	1 ppb / 10 ppb	0,5 ml sol. intermédia 2	50
L6	2 ppb / 20 ppb	1 ml sol. intermédia 2	50
L7	5 ppb / 50 ppb	0,25 ml sol. intermédia 1	50
L8	10 ppb / 100 ppb	0,5 ml sol. intermédia 1	50
L9	20 ppb / 200 ppb	1 ml sol. intermédia 1	50

4.6.2 Preparação dos padrões de controlo

Os padrões de controlo são preparados de forma independente dos padrões de calibração para que seja possível avaliar o estado da calibração sem incorrer em erros redundantes. Para preparar os padrões de controlo dos elementos em estudo, utiliza-se um padrão multielementar de 10 ppm para preparar uma solução intermédia PC, de 100 ppb, pipetando 0,5 ml deste padrão para um balão volumétrico de 50 ml, ajustando o volume final com uma solução de HNO₃ 2%.

A partir desta solução preparam-se os padrões de controlo para os elementos em análise, de acordo com o apresentado na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 - Preparação dos padrões de controlo

Nível	Concentração / ppb	Volume padrão / ml	Volume final / ml
PC 0.1 ppb	0,1	5 ml PC 1 ppb	50
PC 0.5 ppb	0,5	0,25 ml sol. intermédia PC	50
PC 1 ppb	1	0,5 ml sol. intermédia PC	50
PC 10 ppb	10	5 ml sol. intermédia PC	50
PC 50 ppb	50	0,25 ml padrão multielementar	50

Capítulo 5

Resultados e discussão

5 - Resultados e Discussão

5.1 Estabelecimento das condições analíticas e instrumentais

Para iniciar o processo de validação da técnica de ICP-MS foi necessário proceder à realização de determinados estudos que incluem a seleção das massas atômicas de trabalho para os elementos em análise, a seleção de padrões internos adequados, o estudo de interferências poliatômicas e isobáricas e a verificação de determinadas condições instrumentais do equipamento, como a determinação do fluxo de gás na célula de colisão e a energia de discriminação.

5.1.1 Seleção das massas atômicas

As massas atômicas analíticas, foram selecionadas por consulta da bibliografia existente para a análise elementar por ICP-MS. Na Tabela 5.1 apresentam-se os isótopos recomendados na bibliografia consultada, a EPA 200.8 [49] e a EPA 6020A [38]. Na última referência os isótopos são indicados por ordem decrescente de abundância.

Tabela 5.1 - Isótopos dos elementos em análise, recomendados na literatura para quantificação por ICP-MS

Elemento	EPA 200.8	EPA 6020A
Arsénio	<u>75</u>	<u>75</u>
Cádmio	106; 108; <u>111</u> ; 114	<u>114</u> ; 112; <u>111</u> ; 110; 113; 116; 106
Chumbo	<u>206</u> ; <u>207</u> ; <u>208</u>	<u>208</u> ; <u>207</u> ; <u>206</u> ; 204
Crómio	<u>52</u> ; 53	<u>52</u> ; <u>53</u> ; <u>50</u> ; 54
Níquel	<u>60</u> ; 62	58; <u>60</u> ; 62; <u>61</u> ; 64

Como para a maioria dos elementos em estudo existe mais que uma opção de isótopos, a massa utilizada para análise quantitativa de cada elemento foi escolhida com base numa ponderação entre as abundâncias isotópicas e as massas onde a possibilidade de formação de interferências poliatômicas e isobáricas é menor. Com base nestes critérios, apresentam-se na Tabela 5.2 os isótopos selecionados para a validação do método, obtidos com base na Tabela 5.1 e em resultados preliminares de validação obtidos pela participação do laboratório em ensaios interlaboratoriais.

As massas atômicas selecionadas para quantificação dos elementos em estudo, encontram-se destacadas nas tabelas com sublinhado.

Tabela 5.2 - Isótopos dos elementos em estudo selecionados para a validação do método

Elemento	Isótopo
Arsénio	<u>75</u>
Cádmio	<u>111</u> ; 114
Chumbo	<u>206</u> ; <u>207</u> ; <u>208</u>
Crómio	<u>52</u> ; 53
Níquel	<u>60</u> ; 62

5.1.2 Verificação inicial do equipamento

A otimização instrumental inicial é automaticamente efetuada com uma solução de *Tunning* (^7Li , ^{89}Y , ^{133}Ce , ^{205}Tl , ^{59}Co).

A otimização instrumental tem como objetivo atingir as condições instrumentais necessárias para garantir as condições apropriadas à realização de uma análise. Esta otimização instrumental compreende a calibração, otimização e verificação dos seguintes parâmetros:

- ✓ Resolução de três massas que cobrem a gama de massas analíticas;
- ✓ Forma do pico e a possível contaminação com massas vizinhas;
- ✓ Contagens para as massas que cobrem a gama de massas analíticas;
- ✓ Variabilidade das contagens para massas que cobrem a gama de massas analíticas;
- ✓ Relação indicadora da formação de óxidos (Césio/Óxido de Césio);
- ✓ Relação indicadora da formação de duplas cargas ($\text{Ce}^{2+}/\text{Ce}^+$).

Depois de finalizada a otimização dos parâmetros mencionados, são gerados dois relatórios, o *Performance Report* e o *Tune Report*. Nestes relatórios são apresentados os

resultados obtidos para a otimização dos parâmetros de inicialização do equipamento. Exemplos destes relatórios encontram-se nos anexo II e anexo III, respetivamente. Seguidamente, apresentam-se os critérios de aceitação para estes parâmetros:

✓ **Resolução**

Massa 7: Eixo 6,90 – 7,10

Massa 89: Eixo 88,90 – 89,10

Massa 205: Eixo 204,90 – 205,10

W-10%: 0,6 – 0,9 (para todas as massas)

✓ **Sensibilidade – Performance Report**

2500 contagens < Massa 7 < 25000 contagens

5000 contagens < Massa 89 < 50000 contagens

6000 contagens < Massa 205 < 60000 contagens

✓ **Sensibilidade – Tune Report**

1000 contagens < ⁵⁹Co < 10000 contagens

1000 contagens < ⁸⁹Y < 10000 contagens

5000 contagens < ²⁰⁵Tl < 50000 contagens

RSD ≤ 5% (para as massas 7, 89, 205)

Relação de óxidos < 2%

Relação de duplas cargas < 2,5%

Fluxo de hélio: 5 ml/min

Energia de discriminação: 5V

Depois de verificados todos os parâmetros e se todos estiverem dentro do critério estabelecido pode-se proceder à realização da análise, caso contrário é necessário iniciar novamente todo o processo. Se mesmo após a repetição da otimização esta não apresentar os parâmetros indicados dentro dos critérios estabelecidos é necessário proceder à troca dos tubos utilizados para introduzir as soluções de *tunning* e de padrões internos, que podem, devido ao uso, já não se encontrar em condições de serem utilizados. Efetuada a troca da tubagem é necessário repetir todo o processo de otimização desde o início. Se mesmo assim não se obterem os valores desejados é necessário proceder à lavagem dos cones *sampler* e *skimmer* e voltar a iniciar todo o processo de otimização, que pode agora demorar um pouco mais que o normal a atingir os valores ideais para os parâmetros em análise.

5.1.3 Seleção de padrões internos

Quando se pretende selecionar um elemento como padrão interno é necessário que este apresente um comportamento similar ao do analito. Como tal a escolha é feita de forma a que os valores das suas massas e da primeira energia de ionização sejam próximos dos valores dos analitos. Quando se escolhe um padrão interno é também necessário ter em consideração a possível presença deste em amostras, pois os elementos usados para este efeito devem estar presentes nas amostras em teores desprezáveis [39].

Para iniciar a seleção de padrões internos, foram escolhidos 7 elementos para teste: escândio (^{45}Sc), germânio (^{72}Ge), ítrio (^{89}Y), ródio (^{103}Rh), índio (^{115}In), térbio (^{159}Tb) e irídio (^{193}Ir).

Seguidamente foi preparada uma amostra de alimentação animal da entidade AAFCO, denominada “amostra teste”, de acordo com os procedimentos de preparação e digestão de amostras mencionados na secção 4.5, à qual se adicionou uma alíquota dos analitos de interesse, garantindo que todos os analitos se encontravam a níveis quantificáveis, e dos padrões internos (1 ppb). Depois de preparada a amostra efetuaram-se diluições com fatores de 2, 5, 10, 20 e 50, com vista a avaliar o efeito de variação da matriz. Esta amostra e as respetivas diluições foram lidas num ciclo de 6 vezes com a finalidade de avaliar a estabilidade do sinal do padrão interno ao longo do tempo e a sua coerência relativamente ao sinal do analito que pretende corrigir.

Os resultados obtidos para os analitos e para os diferentes padrões internos foram avaliados utilizando como referência um padrão sintético contendo os analitos de interesse e os padrões internos, com concentrações idênticas à da amostra, denominado “P2”.

Nas Figuras 5.1 a 5.3 apresenta-se os resultados obtidos para o arsénio e para os vários padrões internos, no padrão P2, na amostra não diluída e diluída 10 vezes, respetivamente. Na Figura 5.4 condensam-se os resultados obtidos para a amostra para diferentes fatores de diluição.

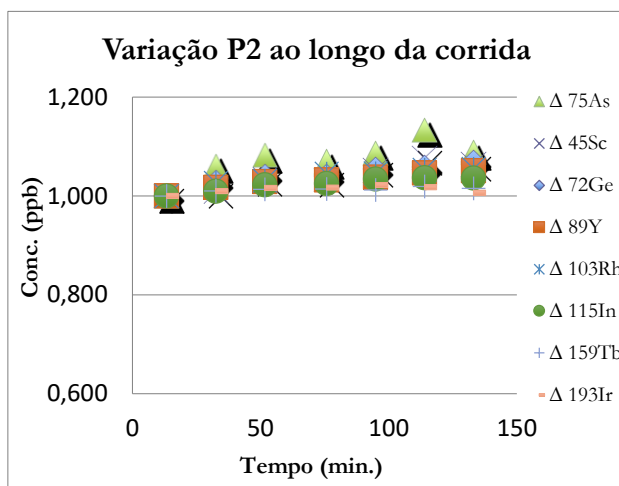


Figura 5.1 - Resultados obtidos para arsênio e padrões internos, no padrão P2 em seis ensaios consecutivos

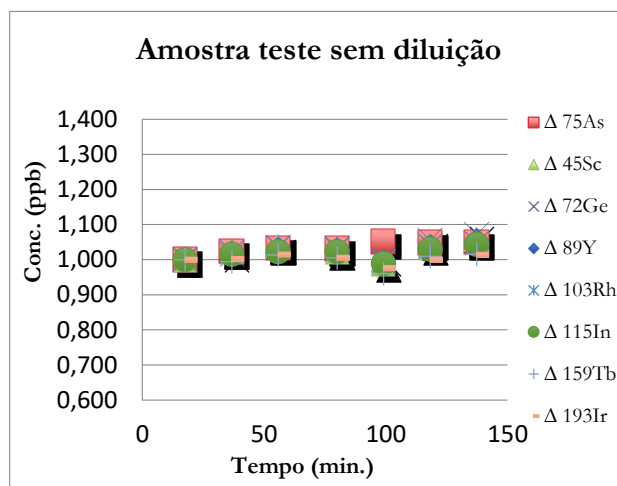


Figura 5.2 - Resultados obtidos para arsênio e padrões internos na amostra teste sem diluição, em seis ensaios consecutivos

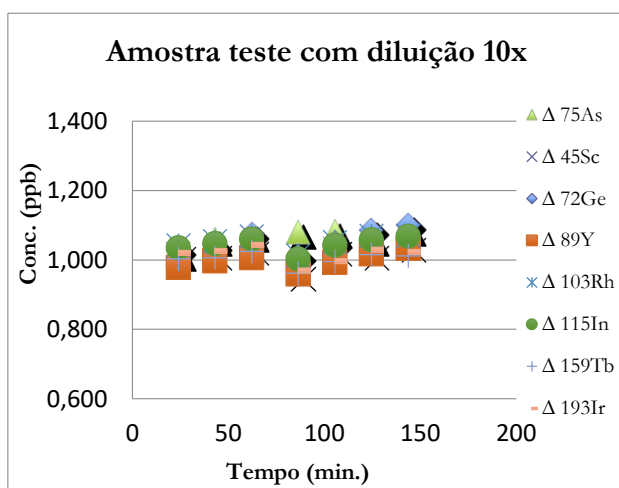


Figura 5.3 - Resultados obtidos para arsênio e padrões internos na amostra teste com fator de diluição 10, em seis ensaios consecutivos

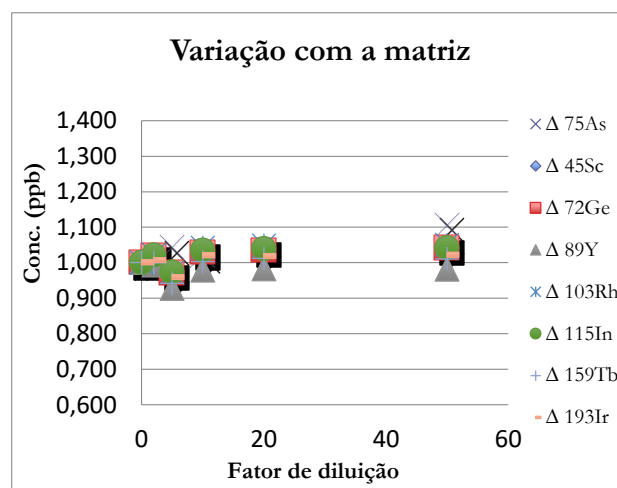


Figura 5.4 - Resultados obtidos para arsênio e para os padrões internos, para a amostra teste e para as diferentes diluições – efeito de variação de matriz

Pela análise dos gráficos conclui-se que todos os padrões internos analisados apresentam um comportamento semelhante nas diferentes condições de ensaio, sendo a escolha destes, com base nestes parâmetros, indiferente.

Nas Figuras 5.5 a 5.8 apresentam-se os resultados obtidos para o cádmio, e nas Figuras 5.9 a 5.12 para o chumbo. Os resultados obtidos para o crómio e para o níquel são apresentados nas Figuras 5.13 a 5.16 e 5.17 a 5.20, respetivamente.

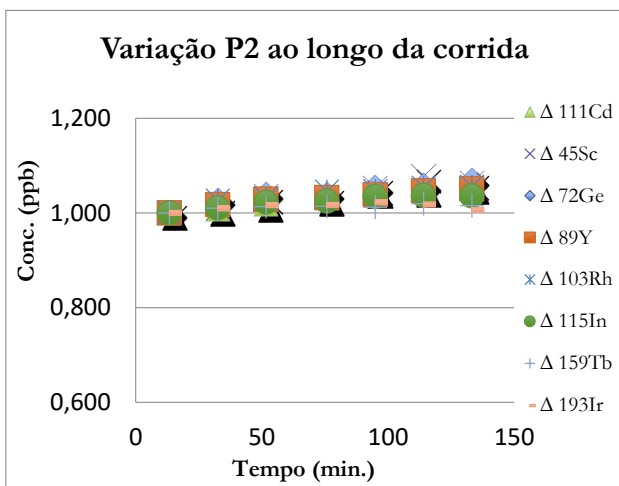


Figura 5.5 - Resultados obtidos para cádmio e padrões internos, no padrão P2 em seis ensaios consecutivos

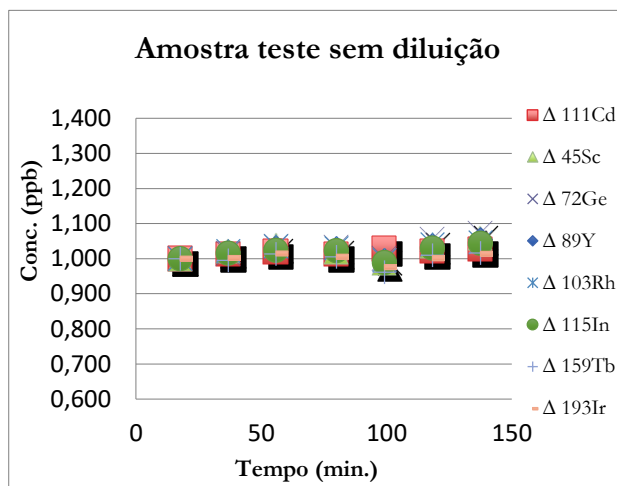


Figura 5.6 - Resultados obtidos para cádmio e padrões internos na amostra teste sem diluição, em seis ensaios consecutivos

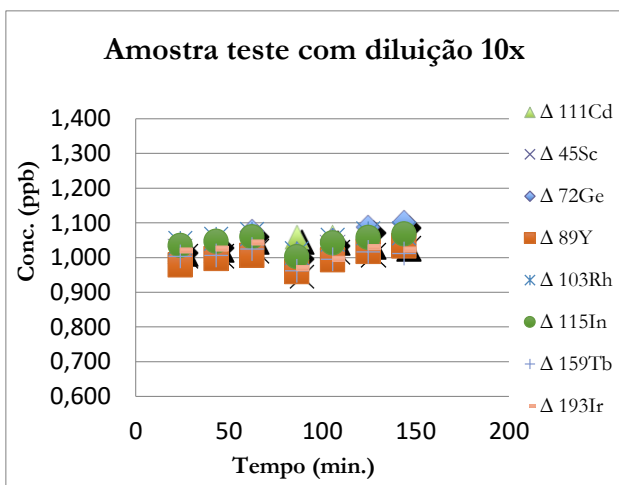


Figura 5.7 - Resultados obtidos para cádmio e padrões internos na amostra teste com fator de diluição 10, em seis ensaios consecutivos

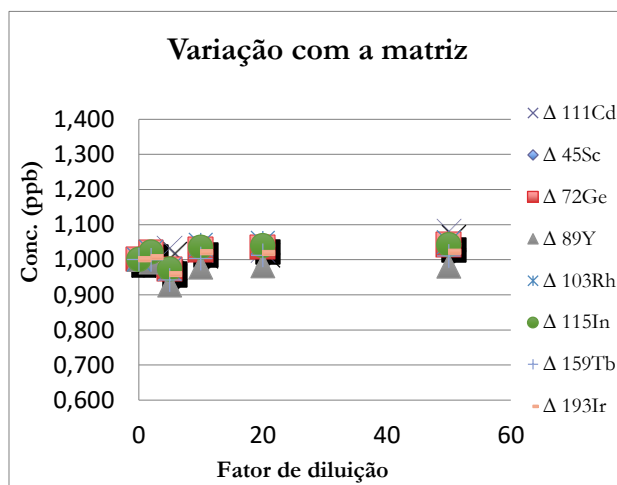


Figura 5.8 - Resultados obtidos para cádmio e para os padrões internos, para a amostra teste e para as diferentes diluições – efeito de variação de matriz

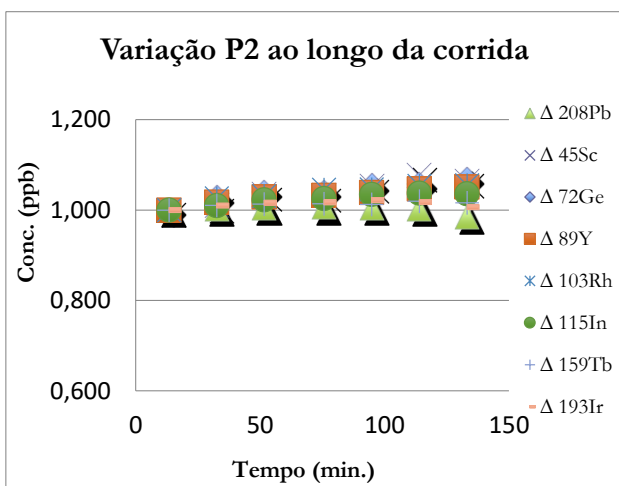


Figura 5.9 - Resultados obtidos para chumbo e padrões internos, no padrão P2 em seis ensaios consecutivos

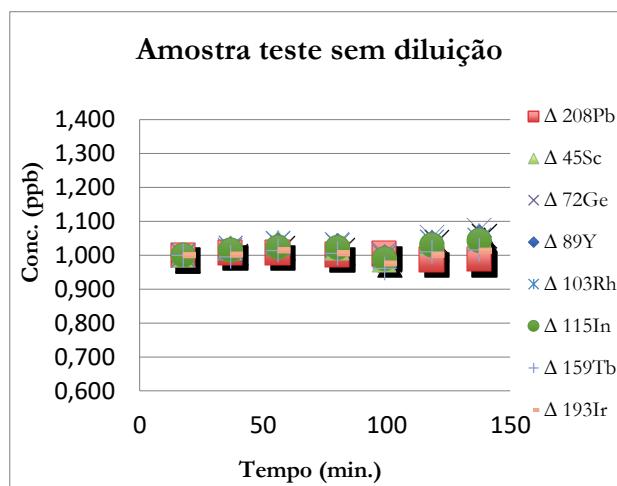


Figura 5.10 - Resultados obtidos para chumbo e padrões internos na amostra teste sem diluição, em seis ensaios consecutivos

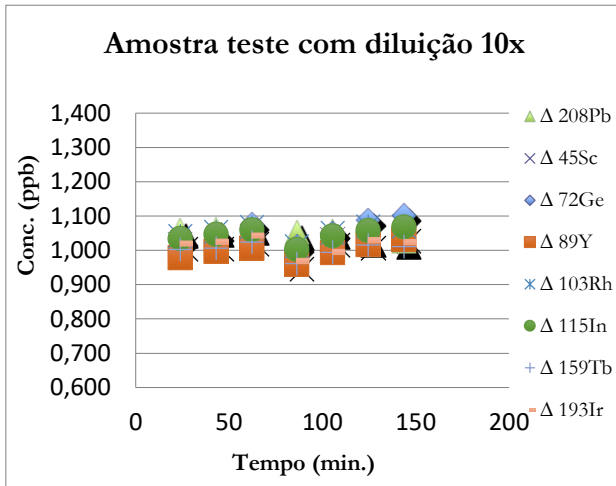


Figura 5.11 - Resultados obtidos para chumbo e padrões internos na amostra teste com fator de diluição 10, em seis ensaios consecutivos

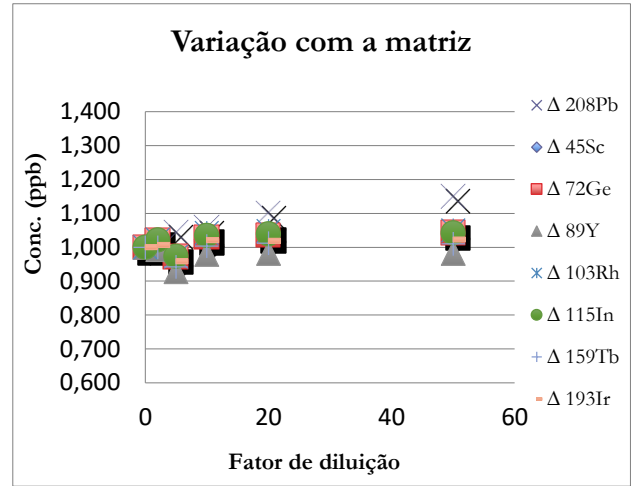


Figura 5.12 - Resultados obtidos para chumbo e para os padrões internos, para a amostra teste e para as diferentes diluições – efeito de variação de matriz

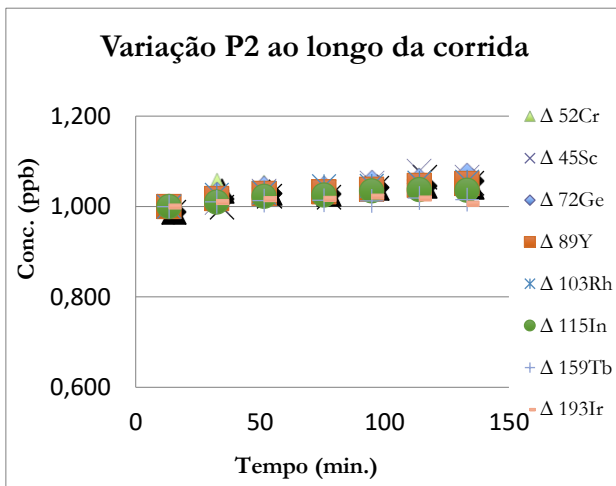


Figura 5.13 - Resultados obtidos para crômio e padrões internos, no padrão P2 em seis ensaios consecutivos

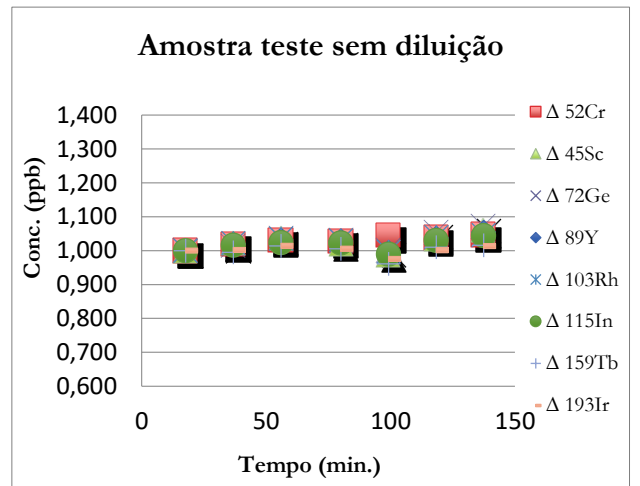


Figura 5.14 - Resultados obtidos para crômio e padrões internos na amostra teste sem diluição, em seis ensaios consecutivos

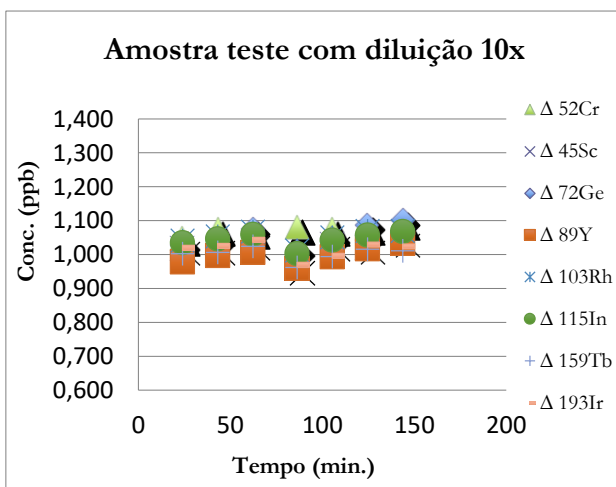


Figura 5.15 - Resultados obtidos para crômio e padrões internos na amostra teste com fator de diluição 10, em seis ensaios consecutivos

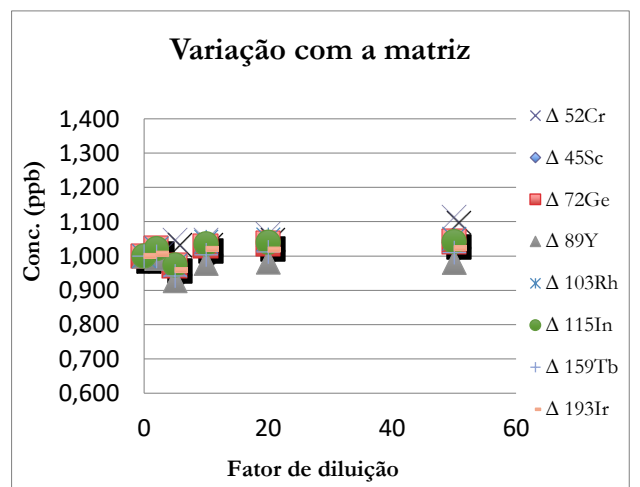


Figura 5.16 - Resultados obtidos para crômio e para os padrões internos, para a amostra teste e para as diferentes diluições – efeito de variação de matriz

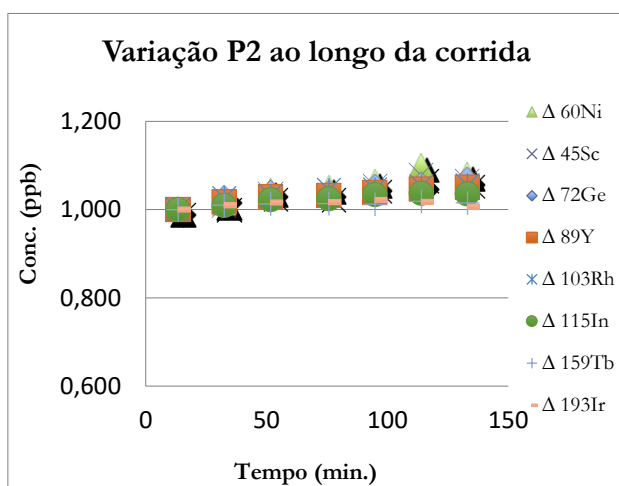


Figura 5.17 - Resultados obtidos para níquel e padrões internos, no padrão P2 em seis ensaios consecutivos

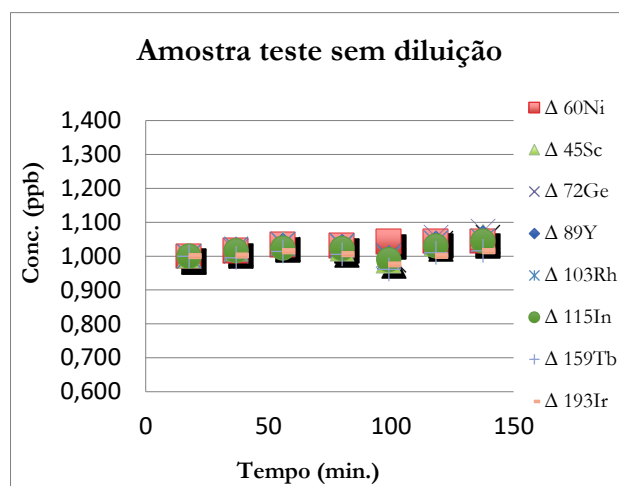


Figura 5.18 - Resultados obtidos para níquel e padrões internos na amostra teste sem diluição, em seis ensaios consecutivos

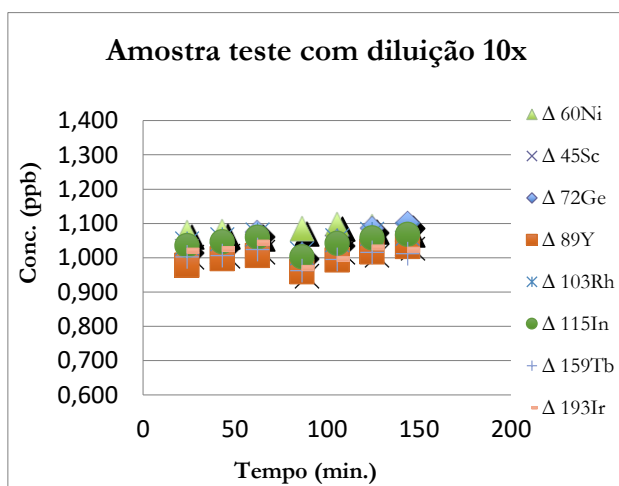


Figura 5.19 - Resultados obtidos para níquel e padrões internos na amostra teste com fator de diluição 10, em seis ensaios consecutivos

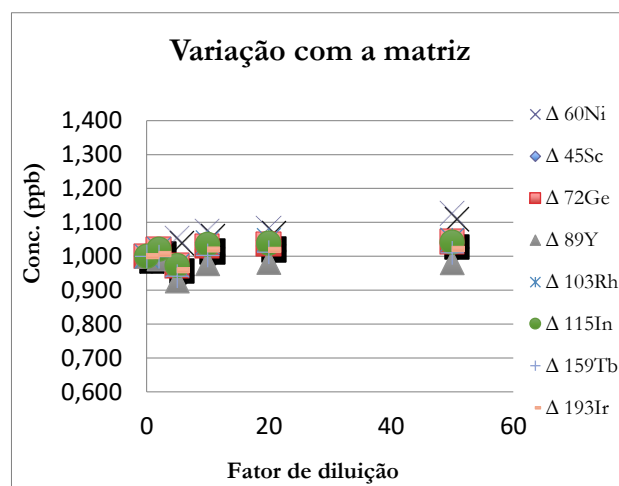


Figura 5.20 - Resultados obtidos para níquel e para os padrões internos, para a amostra teste e para as diferentes diluições – efeito de variação de matriz

Como para todos os elementos, os padrões internos escolhidos para teste apresentaram um comportamento similar nas diferentes condições de ensaio, a escolha baseou-se na proximidade dos valores das massas destes em relação ao analito, bem como nos valores da primeira energia de ionização [58]. Na Tabela 5.3 encontra-se um resumo dos resultados obtidos, bem como os padrões internos selecionados para a validação do método.

Tabela 5.3 - Seleção de padrões internos

Elemento	Proximidade da massa	Proximidade 1ª energia de ionização	Variação P2	Variação com a matriz	Padrão Interno
⁵² Cr	⁴⁵ Sc	Sc	indiferente	indiferente	⁷² Ge
⁶⁰ Ni	⁷² Ge	Rh	indiferente	indiferente	⁷² Ge
⁷⁵ As	⁷² Ge	Ir	indiferente	indiferente	⁷² Ge
¹¹¹ Cd	¹⁰³ Rh	Ir	indiferente	indiferente	¹⁰³ Rh
²⁰⁸ Pb	¹⁹³ Ir	Rh	indiferente	indiferente	¹⁹³ Ir

É também de referir que apesar de não terem sido selecionados todos os elementos testados como padrões internos, os restantes podem ser utilizados numa situação em que uma amostra apresente na sua composição o elemento selecionado para padrão interno.

5.1.4 Estudo de interferências – Seleção das condições instrumentais que eliminam interferências

De forma a estudar quais as condições experimentais que eliminam as interferências de matriz, um branco e um padrão dos analitos de interesse com concentração conhecida (1 ppb) foram contaminados com várias concentrações de elementos que são possíveis causadores de interferências, padrão “P3”.

Os interferentes foram selecionados de acordo com a abundância destes nas amostras lidas em rotina no laboratório, e foram cloretos (ácido clorídrico), carbono (glucose), cálcio (padrão de cálcio de AAS), magnésio (padrão de magnésio de AAS), sódio (padrão de sódio de AAS) e fósforo (padrão de fósforo de AAS).

Com o intuito de determinar quais as melhores condições instrumentais para eliminar as interferências, foram selecionadas cinco concentrações para contaminar o branco e o padrão (5 ppm, 10 ppm, 50 ppm, 100 ppm e 500 ppm) e seis condições do gás da célula de colisão, o hélio (sem gás, 1 ml/min, 2 ml/min, 4 ml/min, 5 ml/min e 6 ml/min). As concentrações dos interferentes tiveram também em conta as amostras analisadas em rotina no laboratório.

Para determinar qual a melhor condição instrumental, os resultados foram tratados comparando os sinais obtidos na ausência de interferente com os sinais obtidos na presença de interferente.

Seguidamente, apresenta-se como exemplo do tratamento de resultados obtidos neste estudo, a interferência de cloretos na determinação de arsénio. Esta interferência está descrita na bibliografia e é uma das mais comuns, surgindo pela potencial presença de espécies como $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$ e $^{38}\text{Ar}^{37}\text{Cl}$ cujo sinal é adicionado ao ^{75}As [45].

Na Figura 5.21 é comparado o comportamento do sinal para a $m/z = 75$ num padrão de arsénio de 1 ppb para diferentes fluxos de hélio na célula de colisão na ausência de cloretos (cor azul) e com 100 ppm de cloretos. É possível observar que tanto na ausência de He na célula de colisão, como para um fluxo de 1 ml/min de He o sinal para a $m/z = 75$ é superior na solução com 100 ppm de cloretos. Contudo a partir de um fluxo de He de 2 ml/min a interferência deixa de se notar, como é visível pela sobreposição das duas linhas.

É ainda possível afirmar pela observação do gráfico, que o sinal vai decrescendo com o aumento do fluxo de He, tal como era expectável.

Na Figura 5.22 avalia-se o mesmo comportamento, mas agora com uma concentração de cloretos de 500 mg/l, e é possível verificar que a interferência é ainda notória para um fluxo de He de 2 ml/min, deixando de ser observada para fluxos superiores.

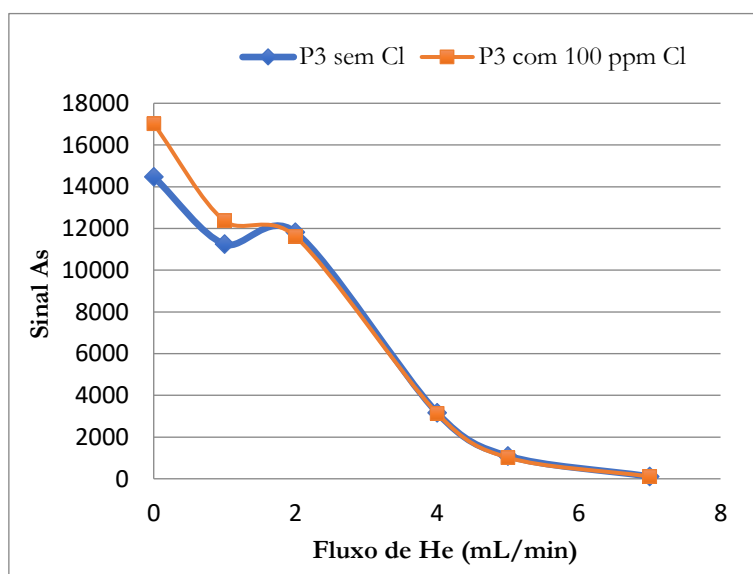


Figura 5.21 - Sinal obtido para $m/z = 75$ no padrão “P3” para diferentes fluxos de He na célula de colisão, na ausência de cloretos (azul) e com 100 ppm de cloretos (laranja)

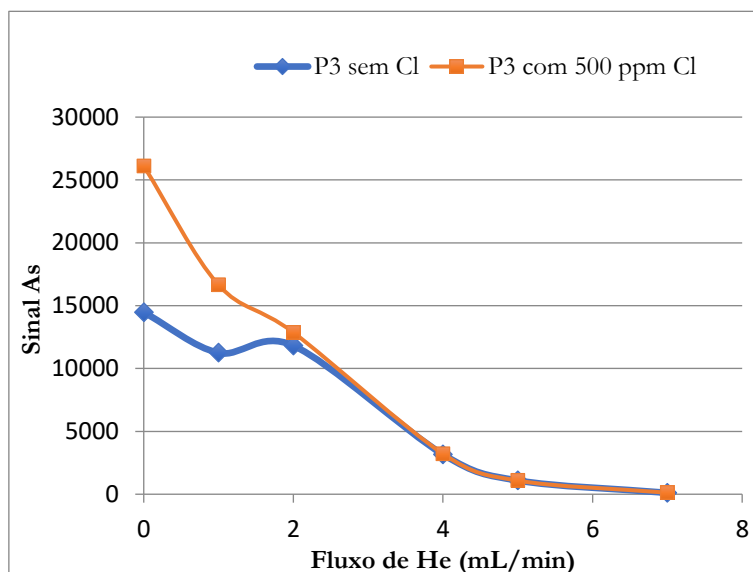


Figura 5.22 - Sinal obtido para $m/z = 75$ no padrão "P3" para diferentes fluxos de He na célula de colisão na ausência de cloretos (azul) e com 500 ppm de cloretos (laranja)

Na Figura 5.23 é possível observar o efeito desta interferência para a condição de $He=0$ ml/min. Verifica-se que nestas condições a razão entre os sinais obtidos para $m/z = 75$ para padrões de 1 ppb de arsênio com e sem cloretos aumenta com a concentração de cloretos. Este comportamento ocorre devido ao aumento da presença de interferentes, como por exemplo as espécies $^{40}Ar^{35}Cl$ e $^{38}Ar^{37}Cl$.

Na Figura 5.24 verifica-se que para um fluxo de He de 5 ml/min não é observado nenhum efeito resultante desta interferência, o que demonstra que a célula de colisão consegue destruir as interferências formadas.

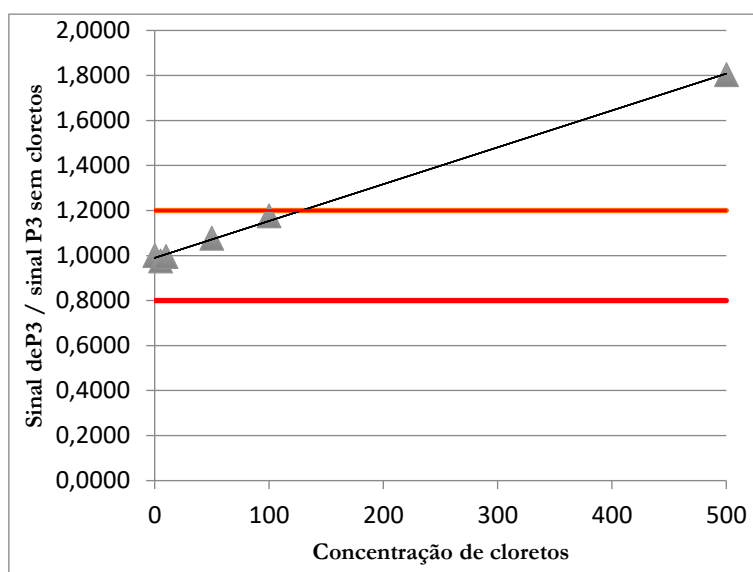


Figura 5.23 - Razão entre o sinal para $m/z = 75$ no padrão "P3" contaminado com diferentes concentrações de cloretos e num padrão isento de cloretos. Modo sem gás

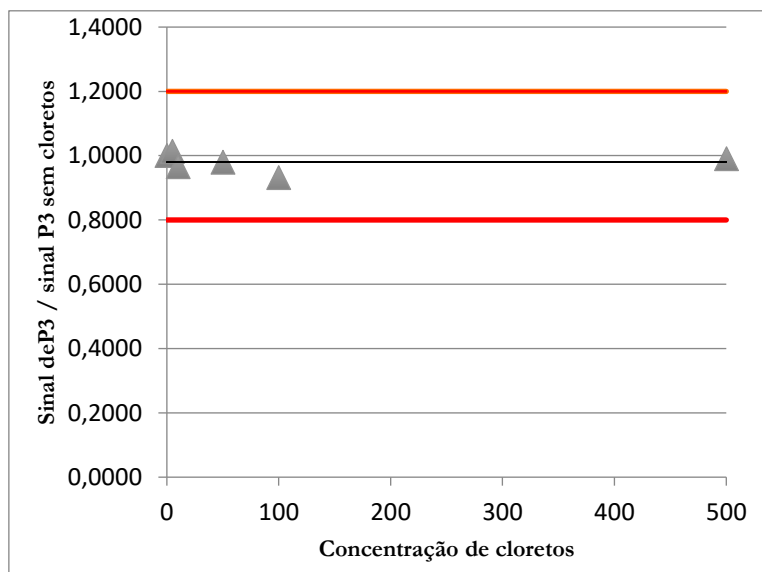


Figura 5.24 - Razão entre o sinal para $m/z = 75$ no padrão "P3" contaminado com diferentes concentrações de cloretos e um padrão isento de cloretos. Fluxo de He 5 ml/min

Os estudos realizados permitiram também verificar que o aumento do fluxo de He na célula de colisão resultou numa melhoria da razão sinal-ruído, como é possível verificar na Figura 5.25. O aumento do fluxo de He provocou uma diminuição do número de contagens no padrão utilizado, contudo o número de contagens do branco também diminuiu consideravelmente, resultando na melhoria desta razão.

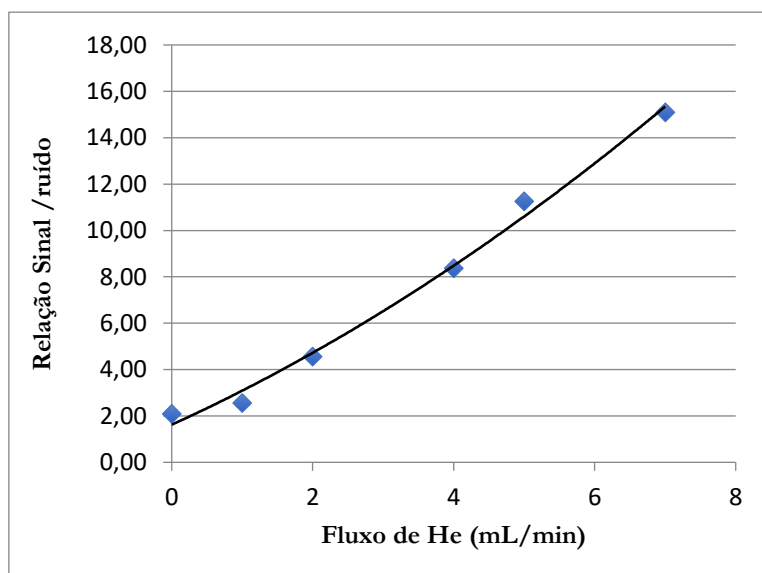


Figura 5.25 - Razão sinal-ruído para $m/z = 75$ na presença de 500 ppm de cloretos

Depois de avaliados todos os resultados obtidos para os outros elementos em estudo, verificou-se que um fluxo de hélio de 5 ml/min é o que apresenta melhores resultados na eliminação de interferências.

O fluxo de hélio selecionado na célula de colisão revelou-se eficiente na eliminação das interferências, não sendo por isso necessário o uso de qualquer correção matemática adicional.

Para o chumbo foi necessário efetuar uma correção que não está relacionada com as interferências, mas sim com as diferentes abundâncias isotópicas que podem existir entre amostras e padrões. Como tal é necessário adicionar às contagens da $m/z = 208$, as contagens da $m/z = 206$ e $m/z = 207$.

Finalizados os testes para verificar a melhor condição para a célula de colisão, efetuaram-se testes para verificar qual o valor de energia de discriminação a utilizar. Para tal, efetuaram-se testes de variação do valor desta energia enquanto as contagens obtidas eram monitoradas, permitindo assim otimizar este parâmetro. Depois de concluídos os testes foi obtido um valor de energia de discriminação de 5V, indo assim ao encontro do valor indicado pelo fornecedor do equipamento.

5.2 Validação do método de determinação de As, Cd, Pb, Cr e Ni em alimentos por ICP-MS

O método utilizado foi adaptado de dois métodos normalizados, a EPA 200.8 [49] e a EPA 6020A [38]. Para validação do método e de forma a garantir a aplicabilidade e adequação à finalidade que o laboratório pretende, foram avaliados os parâmetros a seguir apresentados.

5.2.1 Linearidade

A linearidade foi avaliada a partir da leitura de 4 padrões de calibração para os elementos arsénio, cádmio, crómio e níquel, e 5 padrões de calibração para o elemento chumbo, juntamente com um branco.

Para além da avaliação visual da curva de calibração, foi também realizada uma análise de resíduos de forma a avaliar a linearidade da mesma.

As curvas de calibração obtidas, juntamente com as respetivas equações e coeficientes de correlação, estão apresentadas nas Figuras 5.26 a 5.30.

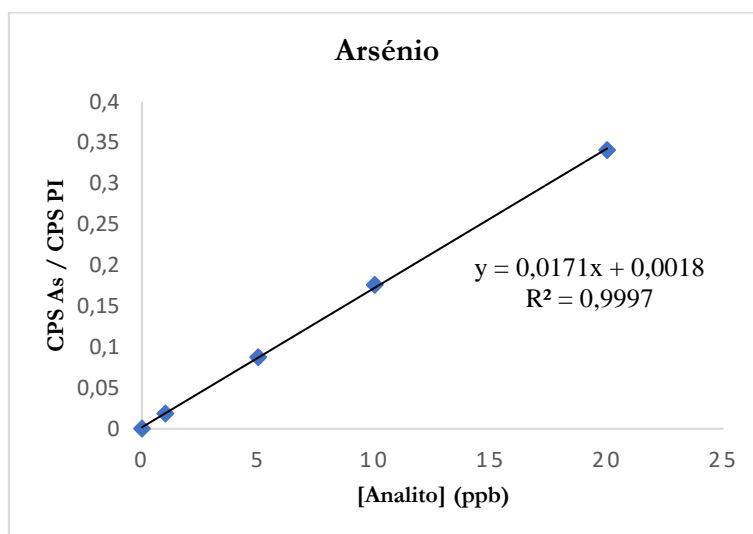


Figura 5.26 - Representação gráfica da curva de calibração obtida para o arsénio

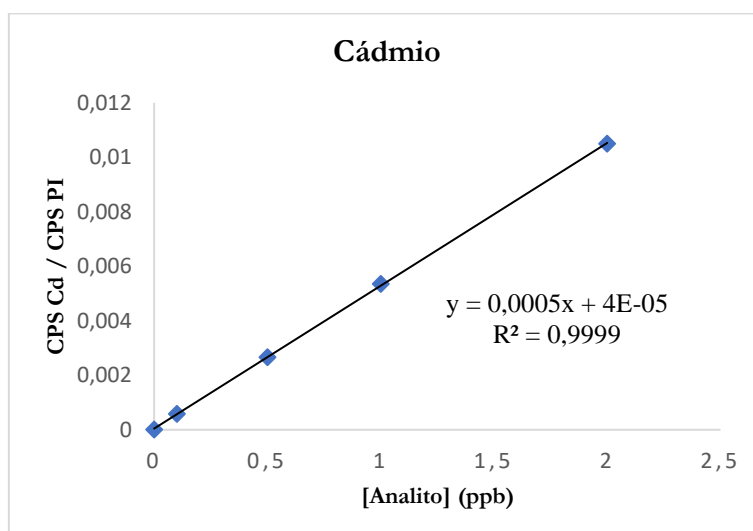


Figura 5.27 - Representação gráfica da curva de calibração obtida para o cádmio

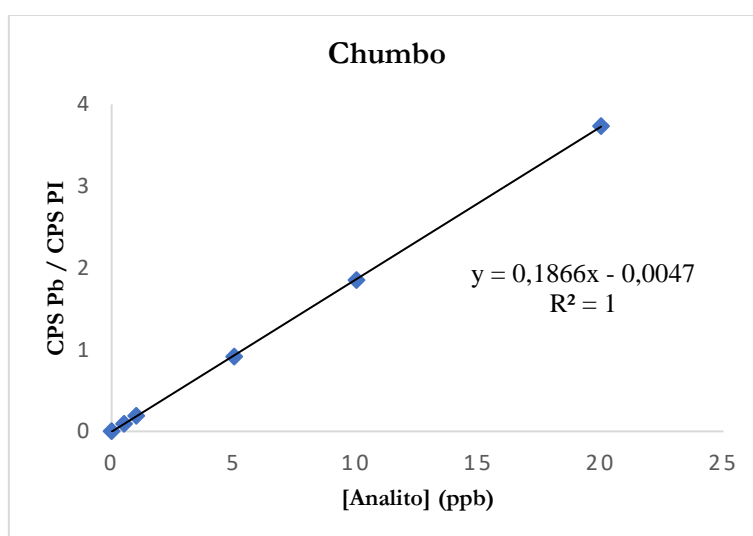


Figura 5.28 - Representação gráfica da curva de calibração obtida para o chumbo

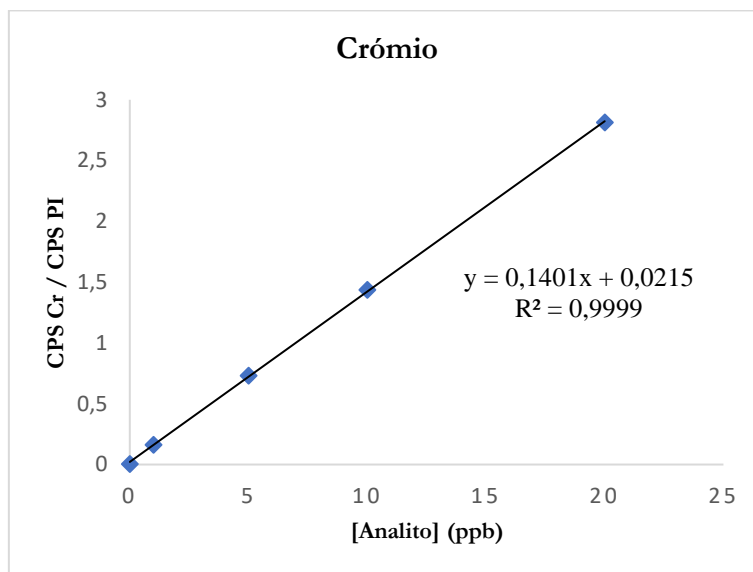


Figura 5.29 - Representação gráfica da curva de calibração obtida para o crômio

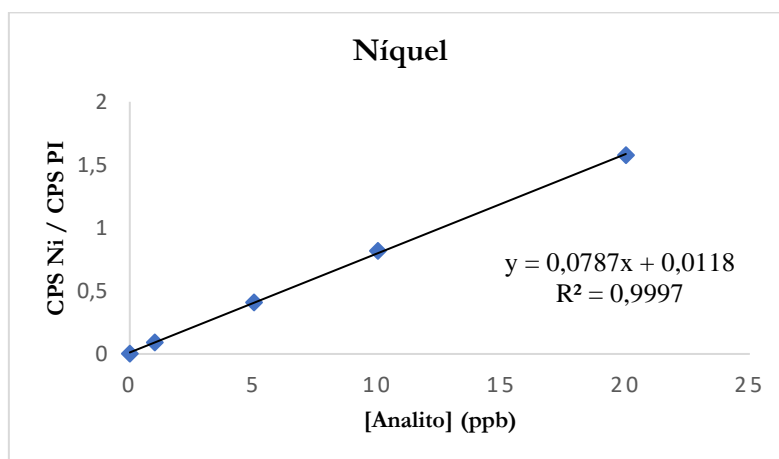


Figura 5.30 - Representação gráfica da curva de calibração obtida para o níquel

A avaliação visual da curva de calibração, apesar de pouco objetiva, é também uma ferramenta possível de ser utilizada, pois pode permitir detetar uma tendência de curvatura dos pontos de calibração, tendência essa que como é possível observar pelas curvas de calibração anteriormente apresentadas, não foi verificada, observando-se assim um bom ajuste linear.

5.2.1.1 Análise de resíduos

Um dos métodos de avaliar a linearidade da curva de calibração é a avaliação dos resíduos, isto é, as diferenças entre cada ponto experimental de calibração e o obtido pela curva do modelo de calibração [59].

Depois de determinados os erros é necessário avaliar os valores obtidos, sendo que o ideal é que estes erros não ultrapassem os 10%. Por análise da Tabela 5.4, onde se apresentam os erros obtidos, pode-se constatar que para todos os padrões, de todos os elementos em estudo, este valor nunca foi ultrapassado, o que permite concluir que existe um bom ajuste linear.

Tabela 5.4 - Resultados obtidos na análise de resíduos

Concentração (ppb) (cádmio/restantes)	Erro (%)				
	Arsénio	Cádmio	Chumbo	Crómio	Níquel
0,05/0,5			-6,83		
0,1/1	7,56	1,73	-4,27	-3,43	5,88
0,5/5	0,52	0,96	1,32	2,43	0,71
1/10	-1,90	-1,07	0,52	-1,10	-1,79
2/20	0,44	0,21	-0,19	0,14	0,40

Esta análise apenas foi efetuada no início do trabalho experimental, sendo que em rotina a linearidade da curva de calibração é analisada através da representação gráfica desta, juntamente com a análise do coeficiente de correlação.

Como uma elevada linearidade de resposta é uma característica inerente ao ICP-MS, estipulou-se como critério do coeficiente de correlação o valor 0.9995, tendo este valor sido respeitado para todos os elementos e em todos os ensaios realizados.

5.2.2 Gama de trabalho

A gama de trabalho definida para cada elemento encontra-se na Tabela 5.5. Esta gama foi definida tendo por base os valores obtidos para os limites de quantificação para os elementos em estudo e a sua adequação à legislação que se encontra em vigor e que fixa os valores máximos destes elementos admissíveis em géneros alimentícios.

Tabela 5.5 - Gamas de trabalho para cada um dos elementos em análise

Elemento	Gama de Trabalho (ppb)
Arsénio	1 – 20
Cádmio	0,1 – 2
Chumbo	0,5 – 20
Crómio	1 – 20
Níquel	1 – 20

5.2.3 Análise de brancos

De forma a determinar quais os critérios de aceitação de brancos para a determinação dos elementos em estudo, analisaram-se 10 brancos de método em condições de precisão intermédia, ou seja, o mesmo laboratório, o mesmo equipamento, mas em dias diferentes e com preparações independentes.

Depois de obtidos os resultados da análise dos brancos de método, foi determinado o limite de quantificação com objetivo de estabelecer um critério de aceitação para os mesmos, critério esse que foi definido como sendo 1/3 do limite de quantificação. Os valores obtidos para o critério de aceitação dos brancos encontram-se na Tabela 5.6.

Tabela 5.6 - Critérios de aceitação de brancos

Elemento	L.Q. (ppb)	Critério de aceitação (ppb)
Arsénio	0,33	0,11
Cádmio	0,05	0,02
Chumbo	1,07	0,36
Crómio	0,28	0,09
Níquel	0,79	0,26

5.2.4 Limiares analíticos

Para determinar os limiares analíticos, possíveis de alcançar com o método que se pretende validar, é necessário calcular os limites de quantificação e deteção.

Os limites de quantificação dos elementos em estudo foram determinados através dos brancos de método, analisados anteriormente, e em condições de precisão intermédia. Para tal aplicou-se a fórmula comumente usada para o cálculo do L.Q., equação 3.2, à qual se associou a diluição final e a massa da amostra.

Depois de calculados os limites de quantificação, calcularam-se os limites de deteção. Os valores obtidos para ambos encontram-se na Tabela 5.7.

Tabela 5.7 - Limiares analíticos obtidos para os elementos em estudo

Elemento	L.Q. (mg/kg)	L.D. (mg/kg)
Arsénio	0,06	0,02
Cádmio	0,01	0,003
Chumbo	0,20	0,07
Crómio	0,05	0,02
Níquel	0,15	0,05

3.2.5 Seletividade e Especificidade

A determinação destes parâmetros permite garantir a qualidade dos resultados obtidos, pois permitem determinar a possível existência de interferências, bem como a sua influência nos resultados.

A determinação da seletividade e especificidade é realizada através de ensaios de recuperação em amostras fortificadas com 0,25 ml da “solução intermédia 2”, cuja preparação é mencionada no tópico 4.6.1. As percentagens obtidas devem apresentar valores entre 70 – 130%, de forma a que seja possível considerar o método específico e seletivo.

Os resultados obtidos nas recuperações de amostras fortificadas encontram-se nas Tabelas 5.8 a 5.12. Na Tabela 5.13 encontram-se os resultados globais obtidos nos ensaios de recuperação das amostras fortificadas. No Anexo IV encontram-se todos os resultados obtidos nas recuperações de amostras fortificadas.

Tabela 5.8 - Resultados obtidos para o arsênio nos ensaios de recuperação de amostras alimentares fortificadas

Matriz	Média da Recuperação (%)	Desvio Padrão (%)	C.V. (%)
Refeição	101	1	1,3
Chá	98,	2	2,0
Rolinho com queijo e fiambre	112	7	5,9
Iogurte liquido	109	3	2,6
Cenoura	88	3	3,3
Cereais	106	2	1,5
Salmão	100	8	7,6
Leite	105	1	1,1
Requeijão	104	2	1,9
Açúcar	96	2	1,6
Gengibre	99	12	11,8
Carne de peru	101	2	2,2
Filete de pescada	99	10	10,0
Aguardente	121	7	6,0
Ovos de consumo	103	2	1,7

Tabela 5.9 - Resultados obtidos para o cádmio nos ensaios de recuperação de amostras alimentares fortificadas

Matriz	Média da Recuperação (%)	Desvio Padrão (%)	C.V. (%)
Refeição	96	3	3,1
Chá	99	2	2,2
Rolinho com queijo e fiambre	102	7	7,1
Iogurte liquido	100	2	1,8
Cenoura	94	4	3,8
Cereais	98	4	4,1
Salmão	92	4	4,6
Leite	100	2	1,9
Requeijão	103	9	8,8
Açúcar	89	1	1,6
Carne de peru	100	3	2,9
Filete de pescada	101	9	8,5
Aguardente	97	3	2,9
Ovos de consumo	94	3	2,8

Tabela 5.10 - Resultados obtidos para o chumbo nos ensaios de recuperação de amostras alimentares fortificadas

Matriz	Média da Recuperação (%)	Desvio Padrão (%)	C.V. (%)
Refeição	95	2	1,6
Chá	104	13	12,3
Rolinho com queijo e fiambre	99	6	6,4
Iogurte liquido	99	3	2,6
Cenoura	86	13	15,0
Cereais	91	7	7,3
Salmão	93	9	10,0
Leite	97	13	12,9
Requeijão	86	14	16,3
Açúcar	82	10	12,0
Gengibre	88	11	12,5
Carne de peru	82	3	3,5
Filete de pescada	95	10	11,0
Aguardente	93	7	7,9
Ovos de consumo	97	11	11,4

Tabela 5.115 - Resultados obtidos para o crómio nos ensaios de recuperação de amostras alimentares fortificadas

Matriz	Média da Recuperação (%)	Desvio Padrão (%)	C.V. (%)
Refeição	98	2	2,0
Chá	94	5	5,2
Rolinho com queijo e fiambre	102	7	7,3
Iogurte liquido	100	3	2,8
Cenoura	85	4	4,2
Cereais	98	2	2,0
Salmão	74	3	4,1
Leite	97	3	3,6
Requeijão	100	4	3,7
Açúcar	89	2	1,8
Gengibre	82	7	8,9
Carne de peru	101	2	2,1
Filete de pescada	97	6	6,3
Aguardente	96	1	1,1
Ovos de consumo	73	2	2,4

Tabela 5.12 - Resultados obtidos para o níquel nos ensaios de recuperação de amostras alimentares fortificadas

Matriz	Média da Recuperação (%)	Desvio Padrão (%)	C.V. (%)
Refeição	94	2	2,3
Chá	89	5	5,0
Rolinho com queijo e fiambre	90	7	7,7
Iogurte líquido	85	4	4,1
Cenoura	89	3	3,5
Cereais	97	3	2,8
Salmão	89	3	3,5
Leite	97	2	1,8
Requeijão	99	9	9,0
Açúcar	85	3	3,4
Gengibre	94	19	19,9
Carne de peru	93	2	2,2
Filete de pescada	99	6	6,0
Aguardente	91	1	1,3
Ovos de consumo	102	2	2,2

Tabela 5.13 - Resultados globais obtidos nos ensaios de recuperação de amostras alimentares fortificadas com os elementos em análise

Elemento	Média da Recuperação (%)	Desvio Padrão (%)	C.V. (%)
Arsénio	103	9	8,8
Cádmio	97	6	6,4
Chumbo	93	11	11,7
Crómio	93	10	10,5
Níquel	93	7	8,0

A partir da análise da tabela anteriormente apresentada é possível verificar que o método é específico e seletivo, pois os valores obtidos nos ensaios de recuperação cumprem o critério de aceitação estabelecido, isto é, $100 \pm 30\%$.

5.2.6 Padrões de controlo

Os padrões de controlo são considerados materiais de referência internos e são lidos em todas as séries de trabalho. A leitura destes permite verificar o desempenho do método, bem como garantir o controlo de qualidade do mesmo.

Na Tabela 5.14 apresentam-se as concentrações dos padrões de controlo seleccionados para os elementos em estudo, que correspondem ao primeiro padrão de calibração de cada elemento. Os padrões de controlo foram escolhidos na zona inferior das curvas de calibração, uma vez que os analitos em causa se encontram a níveis vestigiais nas amostras.

Tabela 5.14 - Padrões de controlo correspondentes ao nível do primeiro padrão das curvas de calibração

Elemento	Padrão de Controlo (ppb)
Arsénio	1
Cádmio	0,5
Chumbo	0,5
Crómio	1
Níquel	1

Para garantir, através dos padrões de controlo, que o método apresenta um bom desempenho, é necessário controlar os limites de concentração dos padrões de controlo estabelecidos. Para tal, é necessário estabelecer um critério de aceitação inicial, de forma a ser possível controlar estes limites. Foi estabelecido um critério de aceitação inicial de 20%.

Contudo, com o decorrer do tempo o critério de aceitação estabelecido inicialmente deve ser revisto, de forma a perceber se há necessidade de estabelecer um novo critério. Isto deve-se ao facto de que, com o passar do tempo, a perícia do analista na execução do método melhora, resultando numa conseqüente melhoria do desempenho do método.

Assim, de forma a perceber se o critério estabelecido pode ser revisto e se é possível estabelecer novos limites de controlo, foram construídas cartas de controlo com a média e o desvio padrão dos valores obtidos para os padrões de controlo ao longo do trabalho realizado. Apesar dos dados disponíveis serem ainda em número reduzido, as cartas de controlo foram mesmo assim construídas com o objetivo de verificar se o método até então desenvolvido se encontra sob controlo. As cartas de controlo obtidas encontram-se nas Figuras 5.31 a 5.35 e os resultados apresentam-se na Tabela 5.15.

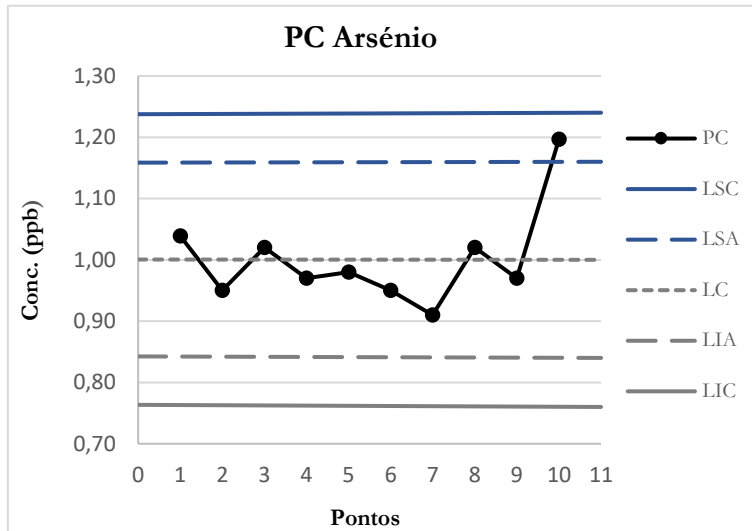


Figura 5.31 - Carta de controlo obtida para o PC de As

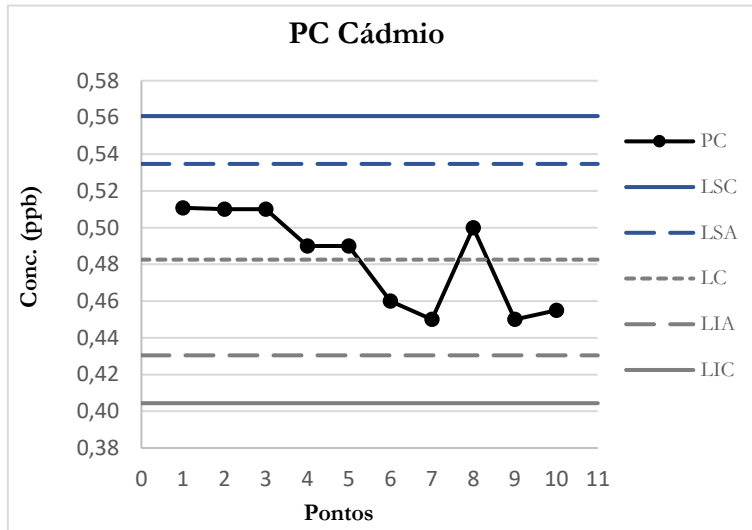


Figura 5.32 - Carta de controlo obtida para o PC de Cd

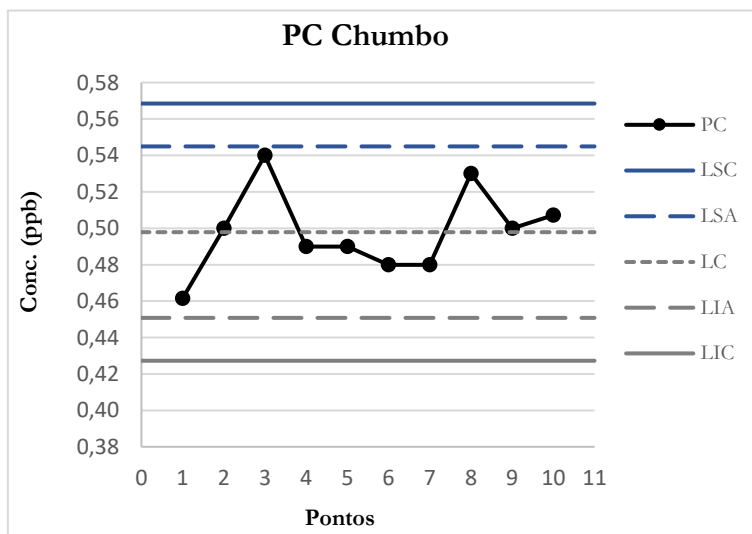


Figura 5.33 - Carta de controlo obtida para o PC de Pb

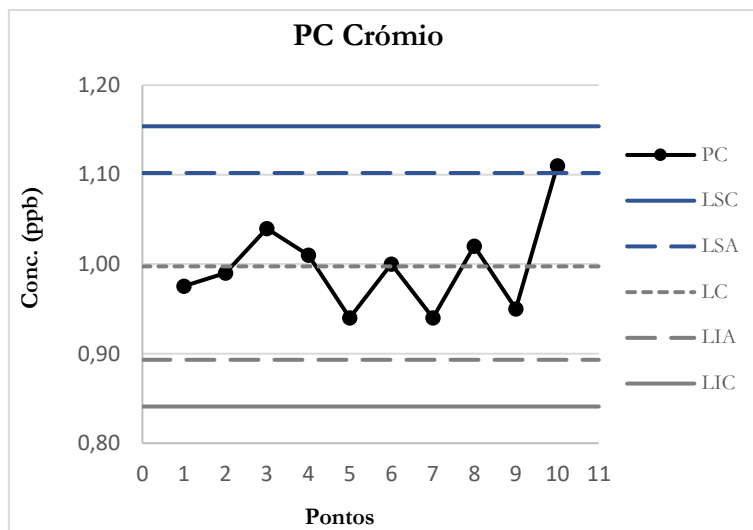


Figura 5.34 - Carta de controle obtida para o PC de Cr

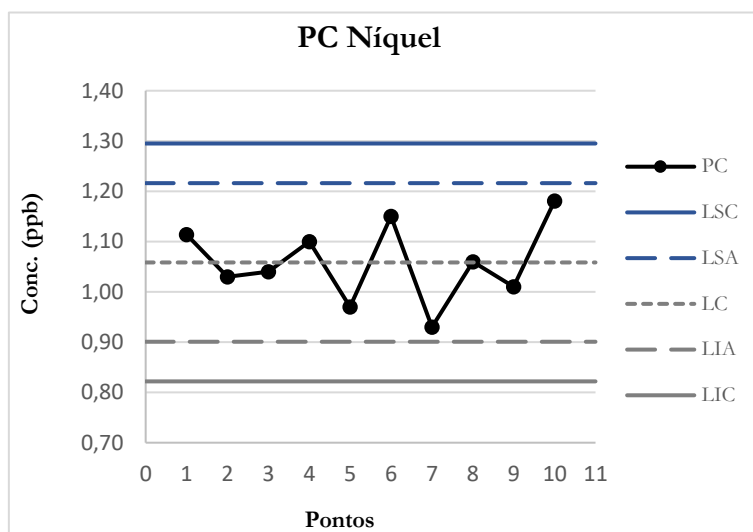


Figura 5.35 - Carta de controle obtida para o PC de Ni

Tabela 5.15 - Resultados obtidos nas cartas de controle construídas para os padrões de controle dos 5 elementos em análise

Elemento	Média (ppb)	Desvio Padrão (ppb)	LC (ppb)	LSA (ppb)	LIA (ppb)	LSC (ppb)	LIC (ppb)
Arsénio	1,00	0,08	1,00	1,16	0,84	1,24	0,76
Cádmio	0,48	0,03	0,48	0,53	0,43	0,56	0,40
Chumbo	0,50	0,02	0,50	0,54	0,45	0,57	0,43
Crómio	1,00	0,05	1,00	1,10	0,89	1,15	0,84
Níquel	1,06	0,08	1,06	1,22	0,90	1,30	0,82

Analisando as cartas de controlo apresentadas, é possível verificar que todos os valores obtidos na análise dos padrões de controlo respeitaram o critério de aceitação inicial de 20%. É também possível verificar, pela análise destas, e tendo em consideração a Norma ISO 7870 que define as regras que permitem verificar se um processo se encontra ou não fora do controlo estatístico, que este método se encontra dentro do controlo [60]. De facto, pela análise das cartas de controlo é possível verificar que em nenhum caso existem pontos fora dos limites de controlo, pois não existem nove pontos consecutivos do mesmo lado do limite central, não existem seis pontos consecutivos em sentido ascendente ou descendente, não existem dois ou três pontos consecutivos na zona entre os limites de aviso e os limites de controlo e também porque não existem oito pontos consecutivos do mesmo lado da linha central sem nenhum na zona entre o limite central e a distância de um desvio padrão deste.

Avaliando os resultados obtidos nos limites de controlo, apresentados na Tabela 5.15, verifica-se que os elementos cádmio, chumbo e crómio apresentam valores inferiores ao estabelecidos inicialmente, o que indica uma melhoria na eficiência do método. Contudo o critério inicial ainda não pode ser revisto pelo número reduzido de dados existentes.

5.2.7 Precisão

5.2.7.1 Repetibilidade

Para estudar a repetibilidade do método foram efetuados 10 ensaios sob a mesma amostra em condições de repetibilidade, isto é, no mesmo dia, com o mesmo equipamento, o mesmo método de ensaio, o mesmo analista e o mesmo laboratório.

A repetibilidade foi determinada para todos os elementos em estudo, a partir do desvio padrão de todos os resultados obtidos, para os vários alimentos e é aqui apresentada por amostra, nas Tabela 5.16 a 5.20, e na Tabela 5.21 apresentam-se os resultados globais, sob a forma de limite de repetibilidade. No Anexo V encontram-se as concentrações obtidas na leitura das amostras utilizadas para o cálculo dos limites de repetibilidade para os cinco elementos em análise

Tabela 5.16 - Limites de repetibilidade e coeficientes de variação de repetibilidade para o arsénio

Matriz	Limite de repetibilidade (%)	C.V. (%)
Refeição	4,1	1,4
Chá	5,8	2,0
Rolinho com queijo e fiambre	14,8	5,2
Iogurte liquido	8,0	2,9
Cenoura	11,1	3,9
Cereais	3,5	1,2
Salmão	12,3	4,4
Leite	3,2	1,1
Requeijão	28,6	10,2
Açúcar	4,7	1,7
Gengibre	20,8	7,4
Carne de peru	7,9	2,8
Filete de pescada	18,5	6,5
Aguardente	1,9	0,7
Ovos de consumo	7,1	2,5

Tabela 5.17 - Limites de repetibilidade e coeficientes de variação de repetibilidade para o cádmio

Matriz	Limite de repetibilidade (%)	C.V. (%)
Refeição	7,3	2,6
Chá	4,8	1,7
Rolinho com queijo e fiambre	17,5	6,2
Iogurte liquido	5,9	2,1
Cenoura	12,5	4,4
Cereais	7,6	2,7
Salmão	14,1	5,0
Leite	5,5	1,9
Requeijão	26,3	9,3
Açúcar	5,7	2,0
Carne de peru	9,7	3,4
Filete de pescada	19,7	7,0
Aguardente	8,5	3,0
Ovos de consumo	9,7	3,4

Tabela 5.18 - Limites de repetibilidade e coeficientes de variação de repetibilidade para o chumbo

Matriz	Limite de repetibilidade (%)	C.V. (%)
Refeição	5,3	1,9
Chá	24,4	8,7
Rolinho com queijo e fiambre	16,8	6,0
Iogurte liquido	7,8	2,8
Cenoura	36,0	12,8
Cereais	17,7	6,3
Salmão	23,1	8,2
Leite	31,3	11,1
Requeijão	48,9	17,3
Açúcar	49,7	17,6
Gengibre	31,4	11,1
Carne de peru	40,6	14,4
Filete de pescada	31,5	11,2
Aguardente	19,0	6,7
Ovos de consumo	28,3	10,0

Tabela 5.19 - Limites de repetibilidade e coeficientes de variação de repetibilidade para o crómio

Matriz	Limite de repetibilidade (%)	C.V. (%)
Refeição	5,4	1,9
Chá	7,3	2,6
Rolinho com queijo e fiambre	18,0	6,4
Iogurte liquido	8,6	3,1
Cenoura	13,8	4,9
Cereais	6,1	2,2
Salmão	10,5	3,7
Leite	8,1	2,9
Requeijão	34,3	12,2
Açúcar	4,9	1,7
Gengibre	21,4	7,6
Carne de peru	8,1	2,9
Filete de pescada	18,1	6,4
Aguardente	3,2	1,1
Ovos de consumo	8,3	2,9

Tabela 5.20 - Limites de repetibilidade e coeficientes de variação de repetibilidade para o níquel

Matriz	Limite de repetibilidade (%)	C.V. (%)
Refeição	6,6	2,3
Chá	5,3	1,9
Rolinho com queijo e fiambre	17,0	6,0
Iogurte líquido	10,3	3,6
Cenoura	10,1	3,6
Cereais	7,2	2,5
Salmão	11,1	3,9
Leite	4,7	1,7
Requeijão	27,2	9,7
Açúcar	9,2	3,3
Gengibre	43,1	15,3
Carne de peru	6,5	2,3
Filete de pescada	17,1	6,1
Aguardente	3,9	1,4
Ovos de consumo	7,1	2,5

Tabela 5.21 - Limites de repetibilidade globais e coeficientes de variação de repetibilidade para os cinco elementos em análise

Elemento	Limite de Repetibilidade (%)	C.V. (%)
Arsénio	8,8	3,1
Cádmio	11,0	3,9
Chumbo	17,8	6,3
Crómio	10,1	3,6
Níquel	10,2	3,6

A forma de determinar se os valores obtidos para o limite de repetibilidade são admissíveis é avaliando o seu coeficiente de variação, que deve ser inferior a 10%. Os resultados apresentados na Tabela 5.21, mostram que todos os valores obtidos para os coeficientes de variação foram inferiores a 10%, o que permite concluir que o método em estudo, em condições de repetibilidade, apresenta boa precisão.

5.2.7.2 Precisão intermédia

A precisão intermédia foi determinada através da realização de vários ensaios em duplicado, em dias diferentes.

Em rotina, o que está estabelecido é ler-se um duplicado por série, contudo no início do processo de validação impera a necessidade de se efetuarem vários duplicados de forma a poder-se estabelecer mais rapidamente um critério de aceitação para os duplicados, que é aceite como sendo o limite superior de controlo destes, determinado através da carta de duplicados.

Na Tabela 5.22 encontram-se os resultados obtidos para a análise da precisão intermédia.

Tabela 5.22 - Resultados obtidos na análise de duplicados para os cinco elementos em análise

Elemento	Amplitude relativa média (%)	LSC (%)
Arsénio	4,1	13,3
Cádmio	4,5	14,5
Chumbo	8,7	28,4
Crómio	3,5	11,3
Níquel	4,2	13,7

Como se pode observar pela análise da Tabela 5.22, a amplitude relativa média apresentou, para todos os elementos em estudo, valores inferiores a 10%, o que permite afirmar que em condições de precisão intermédia, o método apresenta uma boa precisão.

Através da análise dos duplicados, foi também possível estabelecer um critério de aceitação inicial para estes, através do cálculo do limite superior de controlo dos mesmos, obtendo-se os valores apresentados na Tabela 5.22.

3.2.8 Exatidão

O laboratório engloba na sua rotina a participação em ensaios interlaboratoriais promovidos por entidades reconhecidas por cada ciclo de acreditação, sendo um requisito da entidade acreditadora – IPAC.

Para além da participação nestes ensaios, é também necessário que estes apresentem um desempenho satisfatório, isto é, que obtenham um $Z\text{-score} < 2$.

Para avaliar a exatidão do método em estudo, foram utilizadas amostras remanescentes de ensaios interlaboratoriais, que são consideradas materiais de referência certificados. Os MRC utilizados englobam vários géneros alimentícios e alimentos animais.

Através dos resultados obtidos na análise dos MRC e dos relatórios originais de participação em EIL, foi possível calcular os *Z-scores*, que constam da Tabela 5.23.

Tabela 5.23 - *Z-scores* obtidos através da análise de MRC

Elemento	<i>Z-scores</i>						
	AAFCO Lamb Feed, Medicated	AAFCO Dairy Beef Feed	AAFCO Poultry Game Bird Feed	AAFCO Llama Feed	FAPAS Powdered Rice	AAFCO Swine Feed, Medicated	FAPAS Chocolate
Arsénio	0,45	0,10	0,05	0,84	0,00	0,42	
Cádmio	0,91	0,92	0,31	0,49	0,00	0,88	0,00
Chumbo	0,55	1,50	0,73	1,18	0,01	0,85	0,01
Crómio	-1,73	-0,74	-0,68	-0,53		-1,04	
Níquel	-1,15	-1,69	-0,52	-0,77		-1,14	

A avaliação da exatidão do método através da análise de MRC permite concluir que o método em estudo é exato, pois todos os valores de *Z-scores* obtidos são inferiores a 2, ou seja, satisfatórios.

5.2.9 Incertezas

De forma a calcular as incertezas associadas aos resultados obtidos, foram utilizados os dados resultantes do processo de validação, com a finalidade de serem combinadas as componentes da incerteza associadas à precisão e à exatidão.

A estimativa da incerteza associada à precisão foi calculada através da carta de duplicados, lidos em condições de precisão intermédia, enquanto a componente da incerteza associada à exatidão foi obtida através da análise de amostras fortificadas, recuperações, pois o número de MRC disponíveis não era suficiente, para além de que não são lidos em rotina no laboratório.

Os resultados obtidos no cálculo das incertezas, são apresentados na Tabela 5.24.

Tabela 5.24 - Incertezas obtidas na análise dos elementos em estudo

Elemento	u_{precisão}	u_{exatidão}	u_{combinada}	U (%)
Arsénio	0,0359	0,0076	0,0367	8
Cádmio	0,0395	0,0051	0,0398	8
Chumbo	0,0770	0,0088	0,0775	16
Crómio	0,0341	0,0075	0,0349	7
Níquel	0,0372	0,0055	0,0376	8

Capítulo 6

Conclusão

6 – Conclusão

O presente trabalho teve como objetivo a validação e a verificação da adequabilidade às necessidades do laboratório ALS Controlvet de um método de análise multielementar de alimentos por espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente. Além da validação do método, o estágio realizado em ambiente empresarial permitiu também desenvolver competências a nível laboral e adquirir novos conhecimentos.

A espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente é uma técnica que se apresenta como tendo uma elevada sensibilidade e exatidão, resultando assim numa inegável eficiência na análise de elementos.

Contudo, é possível que ocorram interferências, quer espectrais quer não espectrais. Como tal, e de forma a garantir a fiabilidade dos resultados o trabalho iniciou-se com a realização de estudos que permitiram estipular quais as condições experimentais que melhor eliminam as interferências formadas, chegando-se à conclusão que a célula de colisão se revelava mais eficiente na remoção de interferências para um fluxo de hélio de 5 ml/min e energia de discriminação de 5 V.

Realizaram-se também estudos que permitiram determinar os elementos a utilizar como padrões internos, tendo sido selecionados para o efeito o germânio 72, o ródio 103 e o irídio 193.

Iniciou-se a validação do método pela verificação da linearidade de resposta nas curvas de calibração através da preparação e leitura de padrões e um ensaio em branco, seguido do traçado das respetivas retas. A análise visual das curvas de calibração obtidas, bem como avaliação dos respetivos coeficientes de correlação, permitiu confirmar a linearidade das gamas de trabalho em análise. Esta foi verificada por análise visual e também por avaliação dos resíduos. Confirmou-se o bom ajuste linear existente, visto que nenhum dos resíduos ultrapassou o valor de 10%.

A partir da análise de 10 brancos de método em condições de precisão intermédia, determinou-se os critérios de aceitação dos mesmos. Também a partir da análise dos brancos foi possível determinar os limiares analíticos para os elementos em análise.

A avaliação da seletividade e especificidade do método foi efetuada através da realização de ensaios de recuperação, utilizando para tal amostras reais fortificadas. Os resultados obtidos cumpriram o critério de aceitação estabelecido, $100 \pm 30\%$, o que permite concluir que o método é seletivo e específico.

A precisão do método foi verificada através da avaliação da repetibilidade e da precisão intermédia. Em termos de repetibilidade, a precisão foi avaliada através da análise de 10 réplicas das mesmas amostras, para as quais foram obtidos coeficientes de variação inferiores a 10%. A precisão intermédia foi avaliada através da análise de amostras em duplicado, obtendo-se valores de amplitude média relativa inferiores a 10%. Como as duas componentes avaliadas apresentaram valores aceitáveis, é possível afirmar que o método apresenta uma precisão adequada ao uso a que se destina.

Para a avaliação da exatidão do método, utilizaram-se amostras remanescentes de ensaios interlaboratoriais, consideradas materiais de referência certificados. Todos os resultados dos teores de metais em estudo correspondem a valores de *z-score* inferiores a 2, ou seja, satisfatórios, permitindo assim afirmar que o método tem uma exatidão satisfatória.

Finalizada a análise de todos os parâmetros necessários à validação de um método analítico, é possível afirmar que o método em estudo se encontra validado, pois foram obtidos valores satisfatórios para todos os parâmetros analisados, demonstrando assim a adequabilidade do método às necessidades do laboratório.

Concretizada a validação do método, é necessário que o laboratório realize um controlo continuado da sua execução, de forma a garantir que as condições de validade do método se mantenham, garantindo assim a fiabilidade dos resultados.

Bibliografia

- [1] “Metals as contaminants in food . (19 de agosto de 2017). Obtido de <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/metals-contaminants-food>,” p. 2017, 2017.
- [2] Schieberle, P., Grosch, W., & Belitz, H.-D. (2009). *Food Chemistry*. (Springer, Ed.) (4ª Edição). Garching.
- [3] A. N. O. Jardim e E. D. Caldas, “Chemical dietary exposure and the risks to human health.,” *Quim. Nova*, vol. 32, no. 7, pp. 1898–1909, 2009.
- [4] “Mercury, Lead, Cadmium, Tin and Arsenic in Food,” *Food Saf. Auth. Irel.*, no. 1, pp. 1–13, 2009.
- [5] C. D. Klaassen e J. B. Watkins III. (2012). *Fundamentos em Toxicologia*. (artmed Ed.) (2ª Edição). Porto Alegre
- [6] Nordberg, G. F., Fowler, B. A., Nordberg, M., & Friberg, L. (2007). *Handbook on the Toxicology of Metals*. (Elsevier, Ed.) (3ª Edição). London.
- [7] C. Nerín, M. Aznar, e D. Carrizo, “Food contamination during food process,” *Trends Food Science & Technology*., vol. 48, pp. 63–68, 2016.
- [8] P.J. Sanches Filho *et al.*, “Avaliação de metais em pescado da região do Pontal da Barra, Laguna dos Patos, Pelotas-RS,” *J. Brazilian Soc. Ecotoxicol.*, vol. 8, pp. 104–111, 2013.
- [9] S. Morais, F. G. e Costa, e M. de L. Pereira, “Heavy Metals and Human Health,” *Environ. Heal. – Emerg. Issues Pract.*, pp. 227–246, 2012.
- [10] Conselho da União Europeia , “Regulamento (UE) N. o 1881/2006 da Comissão”, *J. Of. da União Eur*, vol. 2015, pp. 1-36, 2006.
- [11] Conselho da União Europeia , “Regulamento (UE) N.o 488/2014 da Comissão”, *J. Of. da União Eur.*, vol. 2014, no. 2, pp. 10–14, 2014.
- [12] Conselho da União Europeia , “Regulamento (UE) 2015/1006 da Comissão,” *J. Of. da União Eur.*, no. 6, pp. 14-16, 2015.
- [13] European Food Safety Authority, “Scientific Opinion on Arsenic in Food,” *EFSA Journal*, vol. 7, no. 10, p. 1351, 2010.
- [14] G. G. Kesici, “Arsenic Ototoxicity,” *J. Otol.*, vol. 11, no. 1, pp. 13–17, 2016.
- [15] Conselho da União Europeia , “Regulamento (UE) 2016/582 da Comissão,” *J. Of. da União Eur.*, pp. 48–53, 2016.

- [16] IARC, “Agents Classified by the IARC Monographs , Volumes 1 – 119,” no. 50, 2012.
- [17] European Food Safety Authority, “Dietary exposure to inorganic arsenic in the European population,” *EFSA Journal.*, vol. 12, no. 3, p. 3597, 2014.
- [18] L. Fernandes e F. Mainier, “Os Riscos da Exposição Ocupacional ao Cádmiio,” *Sist. Gestão*, vol. 9, no. 2, pp. 194–199, 2014.
- [19] European Food Safety Authority, “Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on cadmium in food.,” *EFSA Journal.*, no. 980, pp. 1–139, 2009.
- [20] European Food Safety Authority, “Statement on tolerable weekly intake for cadmium,” *EFSA Journal*, 2011.
- [21] European Food Safety Authority, “Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of chromium in food and drinking water,” *EFSA Journal*, vol. 12, no. 3, p. 3595, 2014.
- [22] European Food Safety Authority, “Scientific Opinion on Lead in Food,” *EFSA Journal*, vol. 8, no. 4, p. 1570, 2010.
- [23] European Food Safety Authority, “Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of nickel in food and drinking water,” *EFSA Journal*, vol. 13, no. 2, p. 4002, 2015.
- [24] A. Controlvet, “Manual de acolhimento,” 2016.
- [25] M. Soy lak, M. Tuzen, I. Narin, e H. Sari, “Comparison of microwave, dry and wet digestion procedures for the determination of trace metal contents in spice samples produced in Turkey,” *J. Food Drug Anal.*, vol. 12, no. 3, pp. 254–258, 2004.
- [26] J. M. R. Antoine, L. A. H. Fung, e C. N. Grant, “Assessment of the potential health risks associated with the aluminium, arsenic, cadmium and lead content in selected fruits and vegetables grown in Jamaica,” *Toxicol. Reports*, vol. 4, no. March, pp. 181–187, 2017.
- [27] G. Cumont *et al.*, “Spectrometry after Dry Ashing : NMKL Collaborative Study,” *J. AOAC Int.*, vol. 83, no. 5, pp. 1204–1211, 2000.
- [28] K. Bakkali, N. R. Martos, B. Souhail, e E. Ballesteros, “Characterization of trace metals in vegetables by graphite furnace atomic absorption spectrometry after closed vessel microwave digestion,” *Food Chem.*, vol. 116, no. 2, pp. 590–594, 2009.

- [29] J. Lori B. Allen, Paul H. Siitonen e Harold C. Thompson, “Methods for the Determination of Arsenic, Cadmiun, Copper, Lead, and Tin in Sucrose, Corn Syrups and High- Fructose Corn Syrups by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 45, no. 96, pp. 162–165, 1997.
- [30] G. Habte *et al.*, “Elemental profiling and geographical differentiation of Ethiopian coffee samples through inductively coupled plasma-optical emission spectroscopy (ICP-OES), ICP-mass spectrometry (ICP-MS) and direct mercury analyzer (DMA),” *Food Chem.*, vol. 212, pp. 512–520, 2016.
- [31] H. Altundag e M. Tuzen, “Comparison of dry, wet and microwave digestion methods for the multi element determination in some dried fruit samples by ICP-OES,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 49, no. 11, pp. 2800–2807, 2011.
- [32] D. Bakircioglu, Y. B. Kurtulus, e G. Ucar, “Determination of some traces metal levels in cheese samples packaged in plastic and tin containers by ICP-OES after dry, wet and microwave digestion,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 49, no. 1, pp. 202–207, 2011.
- [33] N. Khan *et al.*, “Determination of minor and trace elements in aromatic spices by micro-wave assisted digestion and inductively coupled plasma-mass spectrometry,” *Food Chem.*, vol. 158, pp. 200–206, 2014.
- [34] N. Khan *et al.*, “Analysis of minor and trace elements in milk and yogurts by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS),” *Food Chem.*, vol. 147, pp. 220–224, 2014.
- [35] E. Chevallier, R. Chekri, J. Zinck, T. Guérin, e L. Noël, “Simultaneous determination of 31 elements in foodstuffs by ICP-MS after closed-vessel microwave digestion: Method validation based on the accuracy profile,” *J. Food Compos. Anal.*, vol. 41, pp. 35–41, 2015.
- [36] E. P. Nardi *et al.*, “The use of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) for the determination of toxic and essential elements in different types of food samples,” *Food Chem.*, vol. 112, no. 3, pp. 727–732, 2009.
- [37] B. J. Farey e L. A. Nelson, “Atomic Absorption Spectrometry,” *Tech. Instrum. Anal. Chem.*, vol. 5, pp. 67–94, 1982.
- [38] “Method 6020A: Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry,” no. Cd, pp. 1–23, 1998.
- [39] Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2013). *Fundamentals*

- of Analytical Chemistry*. (Brooks/Cole, Ed.) (9ª Edição). Belmont.
- [40] Skoog, D. A., Holler, E. J., & Crouch, S. R. (2007). *Principles of Instrumental Analysis*. (Thomson, Ed.) (6th Editio). Belmont.
- [41] Agilent Technologies, “Agilent 7800/7900 ICP-MS: Hardware Maintenance Manual, 2015”
- [42] R. Thomas. (2007). *Practical Guide to ICP-MS: A Tutorial for Beginners*. (CRC Press) (3ª Edição). Boca Raton.
- [43] PerkinElmer, “The 30-Minute Guide to ICP-MS,” pp. 1–8, 2004
- [44] “Standard Methods 3125 B - Metals by inductively coupled plasma – mass spectrometry”, (22ª Edição), vol. 1640, 2005.
- [45] “ISO 17294-2: Water quality — Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) — Part 2: Determination of 62 elements,” vol. 2003, 2003.
- [46] Agilent, “Collision/Reaction Cells in ICP-MS,” vol. 5990–5955E, 2010.
- [47] N. Yamada, “Kinetic energy discrimination in collision/reaction cell ICP-MS: Theoretical review of principles and limitations,” *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.*, vol. 110, pp. 31–44, 2015.
- [48] S. D. Tanner, V. I. Baranov, e D. R. Bandura, “Reaction cells and collision cells for ICP-MS: A tutorial review,” *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.*, vol. 57, no. 9, pp. 1361–1452, 2002.
- [49] EPA, “Method 200.8, Revision 5.5: Determination of Trace Elements in Waters and Wastes by Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry,” 1994.
- [50] Relacre, “Guia Relacre 3 - Validação de Resultados em Laboratórios Químicos,” 1996.
- [51] Relacre, Guia Relacre 13 - Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química. 2000.
- [52] L. Huber, “Validation of Analytical Methods,” *Agil. Technol.*, vol. 2, pp. 1–65, 2010.
- [53] A. Gustavo González e M. Ángeles Herrador, “A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles,” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 26, no. 3, pp. 227–238, 2007.
- [54] European Medicines Agency, "Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology,” *Prescrire Int.*, vol. 20, no. 121, p. 278, 2011.
- [55] Eurachem and CITAC, “Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement,”

- 2012.
- [56] IPAC, “Guia para a Quantificação de Incerteza em Ensaio Químicos,” pp. 1–19, 2007.
- [57] B. Magnusson, T. Näykki, H. Hovind, e M. Krysell, “Handbook for calculation of measurement uncertainty in environmental laboratories,” *Nord. Rep. TR 537*, 2004.
- [58] S. Tamura, “An empirical correlation between the atomic radius and the first ionization energy for elements,” *J. Mater. Sci. Lett.*, vol. 15, no. 19, pp. 1678–1679, 1996.
- [59] M. F. Pimentel e B. D. B. Neto, “Calibração: Uma Revisão Para Químicos Analíticos,” *Química Nova*, vol. 19, no. 3, pp. 268–277, 1996.
- [60] “ISO 7870-2:2013 Controlcharts - Part 2: Shewhart control charts.” 2013.
- [61] M. del Carmen Bisi Molina, R. de Sá Cunha, L. F. Herkenhoff, G. Mill, “Hypertension and salt intake in an urban population,” *Rev. Saude Publica*, vol. 37, no. 6, pp. 743–750, 2003.
- [62] Conselho da União Europeia, “Regulamento (UE) N.º 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de Outubro de 2011,” *J. Of. da União Eur.*, vol. L 304, pp. 18–63, 2011.

Anexos

Anexo I – Análise de sódio por FAAS

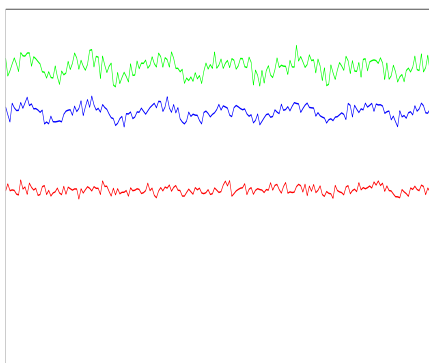
Em paralelo com a validação do método de ICP-MS o presente estágio incluiu também outras atividades dentro da rotina do laboratório com especial relevância para a determinação de sódio em géneros alimentícios. Por esta razão apresenta-se abaixo o princípio da metodologia e um enquadramento da relevância desta determinação.

Breve resumo da metodologia: Incineração da amostra a 550 graus C, digestão da cinza com ácido nítrico, aferição do extrato e análise de sódio por absorção atômica de chama em equipamento com fonte contínua de lâmpada de Xénon.

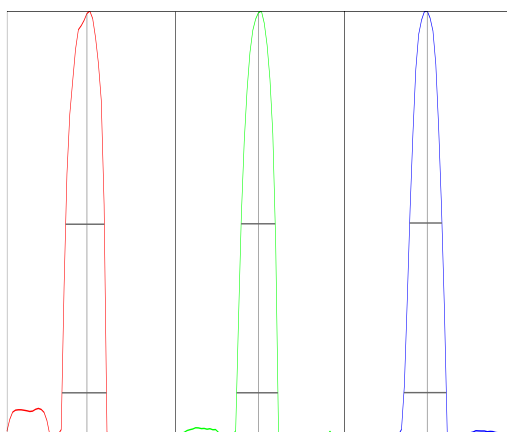
Importância da determinação de sódio: A ingestão de sal é reconhecida como um fator de risco para hipertensão arterial por isso foi estabelecido na regulamentação europeia que define as regras para a rotulagem nutricional (Regulamento 1169/2011) que o teor de sal é um parâmetro de rotulagem obrigatório [61]. Um dos objetivos do referido regulamento consiste em fornecer ao consumidor dados que lhe permitam fazer escolhas informadas relativamente à ingestão dos produtos que seleciona e consome. Com este fim este regulamento estabelece que na rotulagem deve ser usado o termo «sal» e que o valor rotulado corresponde ao equivalente de sal calculado a partir do teor de sódio e da respetiva proporção estequiométrica. Uma vez que a maioria dos géneros alimentícios são obrigados (os casos isentos encontram-se definidos no Anexo V do referido regulamento) à declaração nutricional obrigatória e que esta exige a rotulagem do teor de sal, a análise de sódio é face ao exposto compreensivelmente muito solicitada [62].

Outro exemplo de legislação em que a determinação de sódio é preponderante encontra-se na Lei n.º 75/2009 que estabelece limite ao teor de sal em pão com o objetivo de redução do teor de sal no pão. Esta legislação define que o teor máximo permitido para o conteúdo de sal no pão, após confeccionado corresponde a 0,55 g de sódio por 100 g de pão confeccionado.

Anexo II – Performance Report



Sensitivity			
Mass	7	89	205
Range	5000	2.0E4	2.0E4
Count	2495.37	16772.20	14302.15
RSD%	2.2	2.8	2.4
Integration Time	0.100 sec		
Sampling Period	0.311 sec		
Oxide	156/140	1.15%	
Doubly Charged	70/140	1.12%	

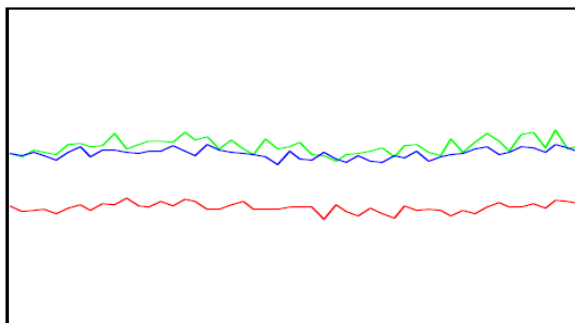


Resolution/Axis			
Mass	7	89	205
Height	2506	16770	14399
Axis	6.95	89.00	205.00
W-50%	0.68	0.60	0.56
W-10%	0.78	0.72	0.74
Integration Time	0.100 sec		
Acquisition Time	22.740 sec		

Anexo III – Tune Report

Batch Folder
Acq. Date-Time
Report Comment
Instrument Name
[He]

G8403A JP15501213



Mass	Range	Count (Actual)	Response (Actual) [cps/ug/l]	Response (Required) [cps/ug/l]	Response (Flag)
59	5000	1880			
89	2000	1141			
205	10000	5472			

Mass	Resp Ratio (Actual)	Resp Ratio (Required)	Resp Ratio (Flag)
59		-	
89		-	
205		-	

Mass	RSD% (Actual)	RSD% (Required)	RSD% (Flag)
59	3.90		
89	4.15		
205	2.81		

Mass	Background (Actual)	Background (Required)	Background (Flag)
59	0.00		
89	0.50		
205	0.40		

Ratio (oxide)	156/140	0.234 %
Ratio (2+)	70/140	1.188 %

Anexo IV - Resultados obtidos nos ensaios de recuperação para todas as amostras fortificadas

Tabela IV.1 - Resultados obtidos nas 10 réplicas de resuperações da amostra refeição para os 5 elementos em estudo

Amostra	Arsénio (%)	Cádmio (%)	Chumbo (%)	Crómio (%)	Níquel (%)
D1	101,15	96,53	94,91	97,96	94,48
D2	99,00	95,27	93,72	95,74	90,19
D3	103,60	101,50	98,46	102,30	97,10
D4	100,94	92,76	94,82	95,42	95,02
D5	99,89	96,35	97,56	96,65	96,34
D6	100,70	95,49	93,94	96,95	91,29
D7	99,24	90,71	94,17	99,23	94,35
D8	99,97	93,49	94,57	97,25	93,50
D9	100,50	98,18	95,80	98,43	92,54
D10	101,93	96,15	95,04	97,59	93,64

Tabela IV.2 - Resultados obtidos nas 10 réplicas de recuperações da amostra chá para os 5 elementos em estudo

Amostra	Arsénio (%)	Cádmio (%)	Chumbo (%)	Crómio (%)	Níquel (%)
D1	96,74	94,44	117,70	101,90	91,92
D2	99,96	97,62	112,37	100,54	92,71
D3	99,79	101,31	93,89	88,06	86,52
D4	100,50	101,30	114,94	94,37	93,06
D5	96,20	98,05	114,13	93,22	87,61
D6	96,81	99,79	93,20	95,60	93,18
D7	94,74	98,38	80,81	86,69	79,11
D8	99,14	101,03	112,17	94,52	88,69
D9	99,96	99,38	91,97	94,80	90,01
D10	98,03	100,77	108,58	89,98	84,91

Tabela IV.3 - Resultados obtidos nas 10 réplicas de recuperações da amostra rolinho com queijo e fiambre para os 5 elementos em estudo

Amostra	Arsénio (%)	Cádmio (%)	Chumbo (%)	Crómio (%)	Níquel (%)
D1	106,66	95,74	93,09	95,63	83,74
D2	106,87	100,28	98,91	99,12	91,73
D3	108,64	95,41	99,44	98,42	87,28
D4	114,08	98,34	96,73	99,86	89,28
D5	110,73	101,86	98,90	103,26	94,61
D6	108,98	101,64	96,26	94,58	83,11
D7	112,92	101,01	97,79	112,35	87,73
D8	112,04	101,57	97,42	97,21	86,00
D9	110,61	98,24	95,27	98,29	85,73
D10	129,41	120,74	116,15	117,06	106,50

Tabela IV.4 - Resultados obtidos nas 10 réplicas de recuperações da amostra iogurte líquido para os 5 elementos em estudo

Amostra	Arsénio (%)	Cádmio (%)	Chumbo (%)	Crómio (%)	Níquel (%)
D1	111,01	101,24	98,99	101,75	88,08
D2	107,22	97,01	98,16	101,99	83,96
D3	115,45	100,60	105,02	105,39	92,97
D4	105,77	98,68	95,69	95,28	82,82
D5	108,25	99,80	100,24	98,56	84,32
D6	108,80	103,13	96,16	99,47	85,58
D7	111,47	98,45	99,33	102,48	85,66
D8	106,70	99,56	99,72	101,02	84,55
D9	108,23	97,99	97,53	98,25	79,70
D10	107,44	99,33	99,62	99,30	85,41

Tabela IV.5 - Resultados obtidos nas 10 réplicas de recuperações da amostra cenoura para os 5 elementos em estudo

Amostra	Arsénio (%)	Cádmio (%)	Chumbo (%)	Crómio (%)	Níquel (%)
D1	87,43	88,66	99,96	83,37	85,83
D2	85,55	88,81	92,58	82,22	85,89
D3	86,57	95,32	76,08	83,80	83,53
D4	86,01	94,26	76,36	83,16	83,96
D5	94,68	98,28	104,93	93,94	93,39
D6	85,88	97,15	76,76	83,71	83,52
D7	90,43	96,50	105,43	88,96	86,07
D8	85,71	89,63	75,53	83,50	84,27
D9	87,28	95,64	77,24	86,99	84,28
D10	86,55	92,30	77,82	84,18	87,66

Tabela IV.6 - Resultados obtidos nas 10 réplicas de recuperações da amostra cereais para os 5 elementos em estudo

Amostra	Arsénio (%)	Cádmio (%)	Chumbo (%)	Crómio (%)	Níquel (%)
D1	106,29	97,97	98,28	97,68	96,22
D2	105,75	99,12	80,05	99,53	95,01
D3	103,90	92,37	92,91	96,78	92,22
D4	105,21	99,57	85,76	99,24	98,73
D5	107,00	94,98	101,92	95,78	94,96
D6	108,23	106,82	90,41	98,91	100,04
D7	106,28	100,16	88,52	99,58	100,08
D8	105,42	95,30	94,79	96,26	95,22
D9	107,29	98,64	84,87	99,22	98,59
D10	102,96	95,15	95,79	94,08	94,16

Tabela IV.7 - Resultados obtidos nas 10 réplicas de recuperações da amostra salmão para os 5 elementos em estudo

Amostra	Arsénio (%)	Cádmio (%)	Chumbo (%)	Crómio (%)	Níquel (%)
D1	102,64	89,89	89,28	74,93	88,60
D2	90,07	92,46	94,73	72,21	87,25
D3	92,80	89,50	79,26	74,36	89,58
D4	98,29	87,77	103,61	71,95	86,73
D5	104,32	94,07	98,79	77,17	95,27
D6	100,16	92,51	76,05	71,33	88,18
D7	97,17	88,28	99,14	73,33	89,59
D8	117,95	102,45	102,22	81,32	93,99
D9	96,96	92,13	93,46	74,35	89,15
D10	100,00	89,58	90,52	72,29	84,92

Tabela IV.8 - Resultados obtidos nas 10 réplicas de recuperações da amostra leite para os 5 elementos em estudo

Amostra	Arsénio (%)	Cádmio (%)	Chumbo (%)	Crómio (%)	Níquel (%)
D1	102,61	98,91	85,23	92,89	93,84
D2	105,37	101,64	109,56	96,50	96,26
D3	103,35	100,34	85,67	96,20	97,67
D4	104,93	98,72	106,83	96,84	99,43
D5	105,77	97,81	106,50	95,72	95,09
D6	104,34	103,92	85,22	95,59	97,38
D7	103,96	98,28	86,04	95,00	95,13
D8	104,64	98,57	115,86	95,94	98,13
D9	104,74	99,61	85,12	95,90	98,49
D10	106,32	98,29	104,02	105,90	96,73

Tabela IV.9 - Resultados obtidos nas 10 réplicas de recuperações da amostra requeijão para os 5 elementos em estudo

Amostra	Arsénio (%)	Cádmio (%)	Chumbo (%)	Crómio (%)	Níquel (%)
D1	103,97	103,40	74,97	102,28	97,93
D2	105,77	98,87	93,04	99,94	97,33
D3	103,01	101,38	74,34	96,96	95,53
D4	102,29	97,22	92,95	97,29	94,73
D5	103,10	96,97	86,71	97,34	93,93
D6	102,84	98,75	71,14	99,28	97,13
D7	103,46	99,92	93,72	100,11	95,93
D8	102,12	102,65	69,42'	99,23	93,53
D9	108,14	105,18	73,30	108,88	100,73
D10	135,48'	127,81	113,62	136,34'	123,73

Tabela IV.10 - Resultados obtidos nas 10 réplicas de recuperações da amostra açúcar para os 5 elementos em estudo

Amostra	Arsénio (%)	Cádmio (%)	Chumbo (%)	Crómio (%)	Níquel (%)
D1	94,02	89,00	70,80	87,07	82,93
D2	94,37	89,45	96,36	86,75	81,51
D3	96,41	89,28	62,88	89,48	83,10
D4	96,16	88,26	59,47	89,81	85,07
D5	93,83	88,24	72,79	88,74	91,70
D6	98,89	92,29	89,20	92,49	88,10
D7	94,85	89,95	65,96	89,37	85,47
D8	95,77	88,37	85,82	88,85	85,31
D9	96,00	87,45	79,72	89,25	84,87
D10	95,99	90,69	61,43'	90,49	85,50

Tabela IV.11 - Resultados obtidos nas 10 réplicas de recuperações da amostra gengibre para os 5 elementos em estudo

Amostra	Arsénio (%)	Cádmio (%)	Chumbo (%)	Crómio (%)	Níquel (%)
D1	94,02	0,55	73,42	74,37	93,67
D2	79,38	19,97	98,31	65,03	72,12
D3	101,21	5,72	91,72	67,91	87,88
D4	106,60	328,81	78,90	69,18	58,52
D5	101,00	722,48	96,08	80,75	128,55
D6	110,71	68,47	86,39	85,48	47,45
D7	112,98	71,50	97,19	81,98	62,41
D8	91,28	154,90	74,66	87,23	132,28
D9	110,21	26,26	102,56	70,40	88,41
D10	83,87	316,56	76,96	91,06	91,94

Tabela IV.12 - Resultados obtidos nas 10 réplicas de recuperações da amostra carne de peru para os 5 elementos em estudo

Amostra	Arsénio (%)	Cádmio (%)	Chumbo (%)	Crómio (%)	Níquel (%)
D1	101,69	102,91	65,36	100,86	94,81
D2	103,78	101,24	66,17	101,80	94,06
D3	101,45	100,83	83,91	105,66	92,56
D4	98,55	96,56	86,44	100,33	91,02
D5	103,56	102,66	63,68	103,45	96,42
D6	99,16	102,30	61,56	101,04	90,99
D7	99,12	96,97	80,49	100,02	93,56
D8	98,81	99,05	59,82	98,99	91,77
D9	101,93	104,06	82,18	101,72	93,39
D10	97,78	96,37	79,06	98,69	90,59

Tabela IV.13 - Resultados obtidos nas 10 réplicas de recuperações da amostra filete de pescada para os 5 elementos em estudo

Amostra	Arsénio (%)	Cádmio (%)	Chumbo (%)	Crómio (%)	Níquel (%)
D1	95,53	99,03	85,70	97,79	98,23
D2	97,43	98,30	89,66	95,89	98,68
D3	93,73	99,07	101,14	92,93	95,57
D4	95,84	98,35	99,17	93,41	96,55
D5	98,09	95,25	82,73	95,55	94,65
D6	95,26	98,60	93,68	93,91	94,94
D7	96,61	110,83	84,65	97,55	102,46
D8	93,84	94,85	95,48	97,77	96,64
D9	126,35	121,41	118,15	113,85	114,53
D10	93,75	94,38	98,78	93,59	96,12

Tabela IV.14 - Resultados obtidos nas 10 réplicas de recuperações da amostra aguardente para os 5 elementos em estudo

Amostra	Arsénio (%)	Cádmio (%)	Chumbo (%)	Crómio (%)	Níquel (%)
D1	127,55	97,80	93,03	96,09	91,78
D2	116,49	96,56	86,15	94,68	90,61
D3	129,99	96,99	96,22	95,70	90,33
D4	113,37	92,67	85,22	97,47	89,87
D5	127,62	96,94	106,20	96,17	91,16
D6	113,53	92,68	87,71	94,81	92,23
D7	113,21	101,90	89,86	94,93	93,57
D8	126,07	98,79	86,99	95,96	89,95
D9	113,98	97,77	102,72	94,65	91,24
D10	126,84	99,21	97,96	94,12	91,63

Tabela IV.15 - Resultados obtidos nas 10 réplicas de resuperações da amostra ovos de consumo para os 5 elementos em estudo

Amostra	Arsénio (%)	Cádmio (%)	Chumbo (%)	Crómio (%)	Níquel (%)
D1	99,38	89,63	103,21	66,90	97,70
D2	102,59	96,72	83,69	72,92	101,11
D3	101,98	93,43	90,46	74,91	103,74
D4	105,55	98,43	109,46	75,20	103,78
D5	103,19	96,10	84,13	71,24	101,75
D6	101,48	92,41	106,21	71,52	105,18
D7	100,36	95,28	112,00	69,47	102,22
D8	103,77	93,37	87,01	74,79	104,34
D9	103,25	94,48	88,47	71,06	100,16
D10	103,56	91,08	103,27	73,58	100,89

Anexo V – Concentrações obtidas na leitura das amostras utilizadas para o cálculo dos limites de repetibilidade para os cinco elementos em análise

Tabela V.1 – Resultados de repetibilidade obtidos na leitura das 10 réplicas da amostra refeição para os 5 elementos em estudo

Amostra	Arsénio (mg/kg)	Cádmio (mg/kg)	Chumbo (mg/kg)	Crómio (mg/kg)	Níquel (mg/kg)
D1	980,14	103,29	919,68	952,94	994,74
D2	964,58	102,58	913,05	936,49	957,94
D3	999,98	107,73	950,41	991,20	1016,56
D4	984,16	100,20	924,52	934,13	1005,79
D5	994,16	105,64	970,90	965,60	1038,03
D6	986,52	103,30	920,29	953,44	973,58
D7	976,81	99,04	926,85	980,36	1007,88
D8	984,73	101,85	931,53	961,69	1000,28
D9	977,63	105,26	931,95	961,22	979,47
D10	1016,09	105,60	947,33	976,47	1012,68

Tabela V.2 - Resultados de repetibilidade obtidos na leitura das 10 réplicas da amostra chá para os 5 elementos em estudo

Amostra	Arsénio (mg/kg)	Cádmio (mg/kg)	Chumbo (mg/kg)	Crómio (mg/kg)	Níquel (mg/kg)
D1	1067,30	121,35	1677,40	2134,40	2600,08
D2	1090,69	123,67	1614,70	2112,21	2599,88
D3	1083,59	126,76	1427,24	1984,33	2534,15
D4	1090,18	126,71	1633,41	2045,91	2598,01
D5	1056,99	124,44	1636,06	2043,28	2552,70
D6	1059,65	125,80	1425,52	2063,46	2604,53
D7	1018,34	122,25	1285,46	1956,41	2448,27
D8	1081,82	126,95	1611,83	2052,10	2559,54
D9	1081,44	124,48	1404,89	2046,83	2564,98
D10	1078,95	127,53	1585,39	2014,74	2529,33

Tabela V.3 - Resultados de repetibilidade obtidos na leitura das 10 réplicas da amostra rolinho com queijo e fiambre para os 5 elementos em estudo

Amostra	Arsénio (mg/kg)	Cádmio (mg/kg)	Chumbo (mg/kg)	Crómio (mg/kg)	Níquel (mg/kg)
D1	1059,86	102,79	933,29	1011,13	1012,60
D2	1069,95	108,04	998,40	1053,14	1098,63
D3	1079,07	102,43	995,80	1038,32	1047,32
D4	1114,85	103,78	953,71	1036,77	1052,95
D5	1069,33	106,02	963,33	1057,95	1093,94
D6	1078,57	108,24	960,97	996,97	1003,04
D7	1104,44	106,45	964,73	1159,35	1038,50
D8	1097,96	107,19	962,99	1013,52	1023,35
D9	1097,28	105,12	953,37	1035,96	1030,99
D10	1259,90	125,19	1139,00	1200,49	1217,19

Tabela V.4 – Resultados de repetibilidade obtidos na leitura das 10 réplicas da amostra iogurte líquido para os 5 elementos em estudo

Amostra	Arsénio (mg/kg)	Cádmio (mg/kg)	Chumbo (mg/kg)	Crómio (mg/kg)	Níquel (mg/kg)
D1	1091,77	101,52	973,54	1000,72	1027,39
D2	1053,65	97,28	964,65	1002,27	986,23
D3	1138,10	101,13	1035,34	1038,99	1077,65
D4	1035,73	98,59	937,05	933,04	972,18
D5	1064,62	100,10	985,84	969,28	990,46
D6	1081,12	104,43	955,47	988,33	1011,55
D7	1103,22	99,39	983,11	1014,24	1008,96
D8	1053,49	100,25	984,56	997,44	995,98
D9	1054,86	97,46	950,62	957,57	937,94
D10	1055,38	99,52	978,59	975,44	1000,18

Tabela V.5 - Resultados de repetibilidade obtidos na leitura das 10 réplicas da amostra cenoura para os 5 elementos em estudo

Amostra	Arsénio (mg/kg)	Cádmio (mg/kg)	Chumbo (mg/kg)	Crómio (mg/kg)	Níquel (mg/kg)
D1	849,48	89,09	1138,39	820,93	901,47
D2	824,51	88,54	1059,34	803,29	895,29
D3	846,10	96,11	910,71	829,84	883,84
D4	844,20	95,47	916,59	827,09	891,58
D5	937,81	100,30	1206,49	941,28	992,55
D6	847,64	98,83	924,71	837,06	891,85
D7	902,82	99,29	1219,75	899,07	926,86
D8	844,28	91,24	911,08	833,30	897,61
D9	854,65	96,60	923,49	862,73	892,85
D10	849,50	93,55	931,01	837,15	927,92

Tabela V.6 – Resultados de repetibilidade obtidos na leitura das 10 réplicas da amostra cereais para os 5 elementos em estudo

Amostra	Arsénio (mg/kg)	Cádmio (mg/kg)	Chumbo (mg/kg)	Crómio (mg/kg)	Níquel (mg/kg)
D1	1171,92	150,68	1079,85	1020,52	1113,74
D2	1171,05	152,22	905,12	1042,86	1105,95
D3	1168,79	147,01	1045,53	1030,65	1092,64
D4	1173,12	153,35	967,14	1046,93	1149,32
D5	1167,48	146,75	1104,66	991,91	1091,36
D6	1201,72	160,39	1012,04	1042,54	1161,07
D7	1192,05	154,73	1001,38	1058,16	1170,54
D8	1176,40	149,24	1057,47	1018,59	1115,70
D9	1176,32	150,85	944,66	1030,74	1132,00
D10	1146,87	148,62	1062,53	992,23	1100,50

Tabela V.7 - Resultados de repetibilidade obtidos na leitura das 10 réplicas da amostra salmão para os 5 elementos em estudo

Amostra	Arsénio (mg/kg)	Cádmio (mg/kg)	Chumbo (mg/kg)	Crómio (mg/kg)	Níquel (mg/kg)
D1	1839,51	92,45	1065,82	912,94	905,53
D2	1702,08	93,74	1107,10	875,96	880,20
D3	1726,33	90,59	953,03	895,03	900,66
D4	1766,76	87,70	1177,39	861,69	860,88
D5	1837,13	94,88	1142,44	921,13	954,53
D6	1810,83	94,69	931,09	874,26	897,88
D7	1777,07	90,11	1155,78	890,92	908,01
D8	1987,72	104,58	1190,98	973,65	955,86
D9	1776,48	94,06	1101,11	902,15	905,02
D10	1783,63	89,48	1051,31	865,25	843,73

Tabela V.8 – Resultados de repetibilidade obtidos na leitura das 10 réplicas da amostra leite para os 5 elementos em estudo

Amostra	Arsénio (mg/kg)	Cádmio (mg/kg)	Chumbo (mg/kg)	Crómio (mg/kg)	Níquel (mg/kg)
D1	1022,34	101,36	1015,21	936,64	942,31
D2	1043,65	103,47	1250,69	966,77	960,70
D3	1013,23	101,18	1005,89	954,22	964,85
D4	1032,76	99,96	1217,08	964,15	985,84
D5	1046,72	99,60	1219,65	958,34	948,38
D6	1013,41	103,73	993,77	939,54	953,07
D7	1015,61	98,82	1006,64	939,20	936,68
D8	1025,07	99,37	1300,44	950,87	968,53
D9	1024,87	100,27	998,93	949,39	970,93
D10	1025,05	97,58	1168,64	1031,94	939,96

Tabela V.9 – Resultados de repetibilidade obtidos na leitura das 10 réplicas da amostra requeijão para os 5 elementos em estudo

Amostra	Arsénio (mg/kg)	Cádmio (mg/kg)	Chumbo (mg/kg)	Crómio (mg/kg)	Níquel (mg/kg)
D1	1003,17	99,76	723,33	986,89	945,58
D2	1038,59	97,08	913,63	981,38	956,40
D3	1017,06	100,10	734,01	957,39	943,92
D4	1007,98	95,80	915,99	958,71	934,17
D5	1009,63	94,96	849,12	953,15	920,49
D6	1022,26	98,16	707,14	986,90	966,20
D7	1024,75	98,97	928,27	991,62	950,87
D8	996,07	100,12	677,17	967,94	912,99
D9	1072,83	104,35	727,19	1080,14	1000,00
D10	1352,68	127,60	1134,39	1361,23	1236,02

Tabela V.10 – Resultados de repetibilidade obtidos na leitura das 10 réplicas da amostra açúcar para os 5 elementos em estudo

Amostra	Arsénio (mg/kg)	Cádmio (mg/kg)	Chumbo (mg/kg)	Crómio (mg/kg)	Níquel (mg/kg)
D1	934,60	88,47	703,73	868,80	846,92
D2	933,28	88,46	952,89	861,18	828,72
D3	945,94	87,60	616,91	881,27	837,91
D4	931,10	85,46	575,82	872,83	846,24
D5	921,73	86,68	715,05	875,04	923,38
D6	973,67	90,88	878,29	913,95	890,11
D7	918,72	87,13	638,85	868,91	850,45
D8	945,23	87,22	846,99	880,22	864,59
D9	932,08	84,91	773,99	869,78	846,60
D10	944,04	89,19	604,13	893,24	863,49

Tabela V.11 - Resultados de repetibilidade obtidos na leitura das 10 réplicas da amostra gengibre para os 5 elementos em estudo

Amostra	Arsénio (mg/kg)	Cádmio (mg/kg)	Chumbo (mg/kg)	Crómio (mg/kg)	Níquel (mg/kg)
D1	1478,22	169,82	824,03	1186,01	1882,21
D2	1336,00	190,28	1075,05	1095,90	1671,06
D3	1532,00	175,95	989,74	1110,08	1809,34
D4	1599,79	495,79	876,01	1132,29	1531,40
D5	1543,94	885,12	1045,58	1246,47	2223,95
D6	1633,62	237,70	944,72	1288,30	1418,83
D7	1670,05	241,58	1063,12	1264,14	1573,79
D8	1446,01	323,31	832,29	1308,92	2258,24
D9	1624,01	196,08	1099,36	1137,05	1817,90
D10	1380,13	485,66	861,62	1354,61	1867,94

Tabela V.12 – Resultados de repetibilidade obtidos na leitura das 10 réplicas da amostra carne de peru para os 5 elementos em estudo

Amostra	Arsénio (mg/kg)	Cádmio (mg/kg)	Chumbo (mg/kg)	Crómio (mg/kg)	Níquel (mg/kg)
D1	998,92	110,90	642,03	992,82	942,44
D2	1020,61	109,38	650,75	1003,29	936,23
D3	1007,22	109,92	833,10	1051,19	930,12
D4	958,67	103,74	840,82	978,04	896,54
D5	1015,26	110,47	624,31	1016,36	956,47
D6	989,97	111,96	614,59	1010,88	919,63
D7	958,94	103,64	778,73	969,80	916,37
D8	952,66	105,31	576,73	956,50	895,94
D9	1018,09	113,75	820,82	1018,05	943,93
D10	961,26	104,56	777,27	972,34	901,69

Tabela V.13 – Resultados de repetibilidade obtidos na leitura das 10 réplicas da amostra filete de pescada para os 5 elementos em estudo

Amostra	Arsénio (mg/kg)	Cádmio (mg/kg)	Chumbo (mg/kg)	Crómio (mg/kg)	Níquel (mg/kg)
D1	1506,55	121,21	876,04	989,77	1003,45
D2	1523,47	120,36	913,05	969,95	1006,32
D3	1496,51	122,04	1033,40	950,18	985,29
D4	1529,63	122,62	1027,25	967,09	1007,51
D5	1540,89	118,49	855,45	977,52	978,15
D6	1523,52	122,83	972,63	971,63	991,20
D7	1525,37	133,59	873,26	996,00	1053,25
D8	1508,11	118,98	988,90	1008,25	1006,49
D9	1836,75	145,95	1219,95	1174,02	1190,22
D10	1512,71	119,06	1027,21	972,54	1007,06

Tabela V.14 – Resultados de repetibilidade obtidos na leitura das 10 réplicas da amostra aguardente para os 5 elementos em estudo

Amostra	Arsénio (mg/kg)	Cádmio (mg/kg)	Chumbo (mg/kg)	Crómio (mg/kg)	Níquel (mg/kg)
D1	135,96	13,30	138,47	130,64	124,78
D2	136,20	13,15	129,34	128,96	123,42
D3	136,49	13,24	143,32	130,62	123,29
D4	135,68	12,57	127,63	132,24	121,94
D5	133,74	12,96	154,02	128,62	121,92
D6	136,25	12,63	131,49	129,18	125,66
D7	136,07	13,87	134,26	129,17	127,33
D8	136,73	13,51	130,94	131,20	122,99
D9	134,68	13,17	150,34	127,47	122,88
D10	136,35	13,53	145,56	128,33	124,93

Tabela V.15 - Resultados de repetibilidade obtidos na leitura das 10 réplicas da amostra ovos de consumo para os 5 elementos em estudo

Amostra	Arsénio (mg/kg)	Cádmio (mg/kg)	Chumbo (mg/kg)	Crómio (mg/kg)	Níquel (mg/kg)
D1	962,26	86,78	1100,62	875,44	946,76
D2	1000,69	94,34	917,59	938,99	987,02
D3	982,46	90,01	972,76	949,39	1000,17
D4	1038,06	96,81	1177,83	967,35	1021,44
D5	1018,82	94,88	931,93	931,18	1005,41
D6	997,28	90,81	1145,00	930,61	1034,40
D7	966,85	91,80	1180,27	896,96	985,57
D8	1011,93	91,05	949,75	957,06	1018,33
D9	1031,28	94,37	984,90	937,49	1001,21
D10	1003,92	88,29	1102,34	941,00	978,82