

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



Avaliação das concentrações dos metais chumbo, manganês e cádmio em leite de vaca e Bebidas de soja existentes no mercado português

Iolanda de Jesus Ribeiro

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

Dissertação orientada por:
Professora Doutora Luísa Mateus
Professora Doutora Deodália Dias

2020

Resumo

O leite de vaca tem vindo a ser cada vez mais substituído pelas bebidas de soja na alimentação portuguesa. Esta substituição deve-se muito à intolerância à lactose, à crescente procura, principalmente pela população mais jovem, de produtos alimentares de origem não animal, menor valor calórico e menor teor de gordura e colesterol. Devido a isso, as bebidas de soja tornaram-se uma alternativa popular ao leite, contribuindo para a prevenção do aparecimento de doenças cardíacas, o cancro, a diabetes, a osteoporose e a obesidade. Contudo, as bebidas de soja e o leite de vaca apresentam características muito diferentes, pelo que só é possível tomar uma decisão consciente, tendo por base essas diferenças.

O leite e os produtos lácteos, para além de serem constituídos por proteínas, lípidos, vitaminas e minerais, podem conter contaminantes químicos, que constituem um fator de risco para a saúde do consumidor, principalmente crianças, por consumirem mais leite em comparação com o seu peso, do que os adultos.

No que diz respeito a contaminantes, a concentração de metais no leite pode ser influenciada por diversos fatores, como: o tipo de leite, as características do solo de que se alimenta a vaca (a alimentação da vaca interfere na composição do leite que esta produz), a composição mineral da água de irrigação, condições atmosféricas e etapas de processamento e armazenamento na produção do leite.

Os metais são o grupo mais abundante de elementos na crosta terrestre. Alguns elementos são essenciais, como o manganês (Mn), o ferro (Fe) e o zinco (Zn), e outros são não essenciais, como o chumbo (Pb), o cádmio (Cd) e o arsénio (As), sendo tóxicos mesmo quando presentes em baixas concentrações. Os efeitos adversos causados na saúde pelos metais tóxicos dependem de diversos fatores, como a via de exposição (inalação, oral ou dérmica), do local de exposição, da duração da exposição e dos órgãos alvo. Por isso, a determinação de metais tóxicos é uma componente importante na segurança e qualidade dos produtos lácteos.

O principal objetivo deste estudo foi determinar as concentrações de Pb, Cd e Mn em leites de vaca e bebidas de soja de diversas marcas adquiridas no mercado português. Os resultados obtidos para esses metais foram comparados entre si, com as ingestões diárias toleráveis estabelecidas/recomendadas por agências reguladoras e com valores publicados em estudos semelhantes.

O Pb e o Cd nas suas formas catiónicas e quando ligados a cadeias curtas de átomos de carbono podem levar ao desenvolvimento de doenças do sistema cardiovascular, rins, sistema nervoso, sangue e sistema esquelético. O Painel CONTAM da EFSA realizou uma avaliação de risco do chumbo e cádmio nos alimentos, estabelecendo um PTWI de 25 e 2.5 $\mu\text{g} / \text{kg}$ de peso corporal, respetivamente.

O Mn é um oligoelemento essencial que está presente em todas as células vivas e é essencial para o desenvolvimento normal. A Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) propôs uma ingestão adequada de Mn, como 3 mg / dia para adultos. Concentrações mais elevadas de Mn podem tornar-se tóxicas, levando a danos neurodegenerativos progressivos que podem provocar sintomas semelhantes à doença de Parkinson.

O Pb, Cd e Mn como estão presentes nos alimentos em baixas concentrações, na ordem das partes por bilhão (ppb), a sua quantificação requer um método analítico preciso com uma sensibilidade adequada, tendo, por isso, sido usado a Espectrofotometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite (GFAAS).

Para demonstrar o grau de confiança dos resultados obtidos foi testada a linearidade, a gama de trabalho, os limites analíticos (limite de detecção e de quantificação), a precisão (repetibilidade e precisão intermediária), a exatidão e a recuperação pós-digestão, testes de validação indicados para este tipo de determinação.

As estimativas das quantidades de Pb, Cd e Mn ingeridas pelo consumo das amostras de leite de vaca e bebida de soja analisadas tiveram em conta as recomendações das diretrizes dietéticas dos EUA. As diretrizes dietéticas dos EUA recomendam o equivalente a 720 ml de leite por dia para adultos e crianças/adolescentes dos 9 aos 17 anos. Para as crianças dos 4 aos 8 anos, recomenda-se uma ingestão diária de 600 ml de leite e dos 2 aos 3 anos de idade, o valor adequado é de 480 ml.

Os resultados obtidos mostram que os leites de vaca têm uma concentração de Pb (média = 193 $\mu\text{g} / \text{L}$) superior à das bebidas de soja (média = 134 $\mu\text{g} / \text{L}$), apesar de não haver uma diferença significativa ($p > 0.05$).

De acordo com a previsão de ingestão diária tolerável de Pb para adultos de 65 Kg e a estimativa da quantidade de Pb consumida por dia pelos adultos através da ingestão dos leites de vaca e das bebidas de soja analisados, observou-se em duas das amostras de leite de vaca analisadas e uma amostra de bebida de soja valores de Pb superiores à ingestão diária tolerável de 232.14 μg .

Para o cádmio, a concentração de Cd nas bebidas de soja (média = 56 $\mu\text{g} / \text{L}$) é superior à encontrada nos leites de vaca (média = 25 $\mu\text{g} / \text{L}$), havendo uma diferença significativa ($p < 0.05$). De acordo com a previsão de ingestão diária tolerável de Cd para um adulto de 65 kg e a estimativa da quantidade de Cd consumida por dia pelos adultos através do consumo dos leites de vaca e bebidas de soja analisados, observa-se que três amostras de leite de vaca e doze amostras de bebida de soja têm valores de Cd superiores ao valor da ingestão diária tolerável de 21.43 μg .

Em relação à quantificação do Mn, a concentração de Mn nas bebidas de soja (média = 1161 $\mu\text{g} / \text{L}$) é cerca de 20 vezes superior à encontrada nos leites de vaca (média = 58 $\mu\text{g} / \text{L}$), havendo uma diferença significativa ($p < 0.05$).

Pela ingestão diária recomendada de Mn pela EFSA e a estimativa da quantidade de Mn consumida por dia pelas crianças e adultos que consomem os leites de soja e leites de vaca analisados, os resultados para as amostras de leite de vaca mostram valores inferiores à dose recomendada por dia para adultos e crianças/adolescentes dos 2 aos 17 anos. No entanto, nas amostras de bebidas de soja, as concentrações de Mn são superiores, principalmente para as crianças dos 2 aos 8 anos, sendo preocupante ao nível da sua formação, uma vez que o órgão mais sensível a elevadas concentrações de manganês é o cérebro.

Para além da comparação com os valores de ingestão diária tolerável ou recomendada, fez-se uma comparação entre os resultados obtidos neste estudo e os valores de outros estudos semelhantes disponíveis na literatura. Foi observada uma discrepância entre os valores obtidos nos vários estudos, possivelmente, influenciada por fatores como, a diferente proveniência dos produtos analisados, o que implica grandes diferenças ambientais (temperatura, humidade, solo), práticas

de cultivo e pastoreio diferentes e a estação do ano em que é obtida a amostra ser também diferente.

A fim de evitar a contaminação ambiental com metais pesados, que é reconhecido como um perigo de saúde pública para todo o mundo, sugere-se uma monitorização dos metais pesados na água potável, uma vez que a água potável é uma das possíveis principais fontes de contaminação do leite.

Neste estudo, os valores obtidos para a ingestão diária de Pb, Cd e Mn, através de amostras de leite de vaca e bebidas de soja foram calculados assumindo as exigências de consumo diário de leite proposto pelas diretrizes alimentares para os americanos. No entanto, o valor recomendado inclui outros produtos lácteos (como o iogurte e o queijo) e, por isso, os resultados obtidos são apenas aproximações, uma vez que outros produtos lácteos podem ter concentrações menores ou maiores desses metais. Além disso, considerou-se a ingestão diária recomendada de Mn por dia, pela EFSA, correspondente à concentração de Mn proveniente por todas as fontes deste metal e não apenas pelo leite. Para além de ter sido calculada uma ingestão diária tolerável de Pb e Cd para um adulto de 65 Kg, excluindo adultos com outro peso (a ingestão diária tolerável depende do peso corporal da criança/adulto). Assim, consumir uma quantidade de leite que exceda estes valores não implica necessariamente um risco aumentado para a saúde. Porém, este tipo de estudo é essencial para garantir a segurança dos alimentos, por permitir fazer uma estimativa da ingestão de metais através da alimentação.

Palavras-Chave: leite de vaca, bebidas de soja, metais, Espectrometria de Absorção Atômica.

Abstrat

Cow's milk has been increasingly replaced by soy drinks by Portuguese people. This substitution is largely due to lactose intolerance, the excessive consumption of products of animal origin and the lower caloric value, lower fat and cholesterol content of soy drinks. Hence, soy drinks have become a popular alternative to milk, contributing to the prevention of heart disease, cancer, diabetes, osteoporosis and obesity. However, soy drinks and milk have very different characteristics, so it is only possible to make a conscious decision, based on these differences.

Milk and dairy products, in addition to being made up of proteins, lipids, vitamins and minerals, can contain chemical contaminants, such as metals, may constituting a risk factor for consumer's health, especially children as they consume more milk in comparison with their weight, than adults.

The concentration of metals in milk can be influenced by several factors, such as: the type of milk, the characteristics of the soil from which it originated, the mineral composition of the irrigation water, atmospheric conditions and processing and storage steps in the production of milk.

Metals are the most abundant group of elements in the earth's crust. Some elements are essential, such as manganese (Mn), iron (Fe) and zinc (Zn), and others are non-essential, such as lead (Pb), cadmium (Cd) and arsenic (As), being toxic even when present in low concentrations. The adverse health effects of toxic metals depend on a number of factors, such as the route of exposure (inhalation, oral or dermal), the exposure site, the duration of exposure, and the target organs. Therefore, the determination of toxic metals is an important component to the safety and quality of dairy products.

The main objective of this study was to determine the concentrations of Pb, Cd and Mn in cow milks and soy beverages, from different brands in the Portuguese market. The results obtained were compared with each other, with the tolerable daily intake established/ recommended by regulatory agencies and with values published in similar studies.

Pb and Cd in their cationic forms and when attached to short chains of carbon atoms can lead to the development of diseases of the cardiovascular system, kidneys, nervous system, blood and skeletal system. The EFSA CONTAM Panel carried out a risk assessment of Pb and Cd in food, establishing a PTWI of 25 and 2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of body weight, respectively.

Mn is an essential trace element that is present in all living cells and is essential for normal development. The European Food Safety Authority (EFSA) has proposed an appropriate intake of Mn of 3 mg per day for adults. Higher concentrations of Mn can become toxic, leading to progressive neurodegenerative damage that can cause symptoms similar to Parkinson's disease.

Pb, Cd and Mn, as they are present in foods in low amounts, in the order of parts per billion (ppb), their quantification requires a precise analytical method with an adequate sensitivity, having therefore been used in Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometry (GFAAS).

To guarantee the reliability of analytical data, a validation method was carried out that includes linearity, the working range, analytical limits (limit of detection and quantification), precision

(repeatability and intermediate precision), accuracy, specificity / selectivity and post-digestion recovery.

Those loaded with the amounts of Pb, Cd and Mn ingested by consuming the analyzed amounts of cow's milk and soy drink took into account the recommendations of the US dietary guidelines. US dietary guidelines recommend the equivalent of 720 ml of milk per day for adults and children / adolescents aged 9 to 17. For children aged 4 to 8 years, a daily intake of 600 ml of milk is recommended and from 2 to 3 years of age, the appropriate amount is 480 ml.

The results found show that cow's milk has a Pb concentration (mean = 193 $\mu\text{g} / \text{L}$) higher than soy drinks (average = 134 $\mu\text{g} / \text{L}$), although there is no significant difference ($p > 0.05$). According to tolerable daily intake of Pb for adults of 65 kg and the estimate of the amount of Pb consumed per day by adults through the intake of cow's milk and the expected by soy drinks, it was observed in two of the cow milk of analyzed cow and a sample of soy drink with an equal value, all of these Pb values being higher than the tolerable daily intake of 232.14 μg .

Concentration of Cd in soy drinks (mean = 56 $\mu\text{g} / \text{L}$) is significantly higher ($p < 0.05$) than that found in cow's milk (average = 25 $\mu\text{g} / \text{L}$).

According to the tolerable daily intake of Cd for an adult of 65 kg and the estimate of the amount of Cd consumed per day by adults, through the consumption of cow's milk and soy drinks, it is observed that three of milk from cow's milk and twelve soy drink drinks have Cd values higher than the tolerable daily intake value of 21.43 μg .

Regarding the quantification of Mn, the concentration of this metal in soy drinks (mean = 1161 $\mu\text{g} / \text{L}$) is about 20 times higher than that found in cow's milk (mean = 58 $\mu\text{g} / \text{L}$), with significant difference ($p < 0.05$).

According to EFSA's recommended daily intake of Mn and the estimated amount of Mn consumed per day by children and adults who consume the estimated soymilk and cow's milk, the results for calculating cow's milk values below the recommended dose per day for adults and children / teenagers from 2 to 17 years old. However, in the administrations of soy drinks, as they are from Mn, they are superior, mainly for children from 2 to 8 years old, being of concern in terms of their formation, since the organ most sensitive to high manganese is the brain.

A comparison was also made between the results obtained in this study and the values of other similar studies available in the literature. A discrepancy was observed between the values chosen in the various studies, possibly influenced by factors such as the different origin of the products, which may implies large differences (temperature, humidity, soil), different cultivation and grazing practices and the season of the year.

In order to avoid environmental contamination with heavy metals, which is recognized as a public health hazard for the whole world, they must be monitored, mainly in terms of drinking water, since drinking water is one of the main possible sources of contamination in cow milk and soy beverages.

Keywords: cow's milk, soy milk, metals, Atomic Absorption Spectrometry.

ÍNDICE

Resumo.....	I
Abstract	IV
Lista de Tabelas e Figuras	VIII
Lista de Abreviaturas	XI
1. Introdução.....	1
1.1. Segurança Alimentar	1
1.2. Contaminantes.....	1
1.3. Leite de vaca e bebida de soja - aspetos nutricionais e contaminantes.....	3
1.3.1 Leite de vaca.....	3
1.3.2 Bebida de soja	4
1.4. Metais Seleccionados	7
1.4.1. Chumbo.....	9
1.4.2. Cádmio.....	11
1.4.3. Manganês	14
1.5. Métodos de Determinação de Metais	16
1.5.1. Digestão das amostras.....	17
1.5.2. Espectrometria de Absorção Atómica.....	19
1.5.2.1. Espectrometria de Absorção Atómica em Forno de Grafite	20
2. Objetivos	22
3. Materiais e Métodos.....	23
3.1. Caracterização das amostras	23
3.2. Reagentes.....	23
3.3. Material e equipamento	23
3.4. Preparação das amostras	24
3.5. Quantificação dos metais	25
3.6. Método de Validação.....	27
3.6.1. Avaliação Indireta.....	27
3.6.1.1. Linearidade	27
3.6.1.2. Gama de trabalho	28
3.6.1.3. Limiares analíticos	29
3.6.1.4. Precisão.....	30
3.6.1.5. Especificidade / Seletividade	31
3.6.1.6. Estudo da variação do método de digestão	31

3.6.2. Avaliação Direta.....	32
3.7. Tratamento Estatístico.....	33
4. Resultados e Discussão.....	34
4.1. Validação do Método.....	34
4.1.1. Avaliação Indireta.....	34
4.1.1.1. Linearidade.....	34
4.1.1.2. Gama de trabalho.....	36
4.1.1.3. Limiares analíticos.....	37
4.1.1.4. Repetibilidade.....	38
4.1.1.5. Precisão intermediária.....	39
4.1.1.6. Especificidade / Seletividade.....	40
4.1.1.7. Estudo da variação do método de digestão.....	40
4.1.2. Avaliação Direta.....	41
4.2. Quantificação e comparação das concentrações dos metais Pb, Cd e Mn nas diferentes marcas de leite de vaca e bebida de soja.....	42
4.3. Comparação dos resultados experimentais com os valores de ingestão diária recomendada para o Pb, Cd e Mn.....	46
4.4. Comparação dos resultados obtidos neste estudo com os resultados publicados noutros estudos com o mesmo tipo de amostras.....	52
5. Conclusões.....	56
6. Referências Bibliográficas.....	58
7. Anexos.....	66

Lista de Tabelas e Figuras

Tabela 1.1 - Composição do leite de soja e do leite de vaca por 100 ml de leite (Dutra de Oliveira et al. 1982).....	6
Figura 1.1 - Visão geral da toxicologia de metais (Klaassen, 2013).....	8
Figura 1.2 - Transporte de cádmio, ligação de proteínas e toxicidade. GSH, glutatona; MT, metalotioneína; aa, aminoácidos; Cd-Alb, Cd-albumina; Cd-LMWPr, Cd associado a proteínas de baixo peso molecular (Klaassen, 2013).	13
Tabela 1.2 - Resumo da ingestão adequada de manganês (EFSA, 2013)	15
Figura 1.3 - Espectrômetro de absorção atômica básico de feixe único (adaptado de Beaty and Kerber, 1993).....	20
Tabela 3.1 - Tipos de bebidas selecionadas para o estudo: cada amostra é designada por uma letra de A a β; as amostras foram agrupadas de acordo com o tipo de bebida, em que cada amostra representa uma marca diferente de bebida	23
Tabela 3.2 - Material e equipamento utilizados na preparação das amostras e nos métodos de análise	24
Figura 3.1 - Digestor de microondas (Berghof Speedwave Two): Equipamento usado para a digestão das amostras. Este modelo tem capacidade para 10 vasos.....	25
Tabela 3.3 - Programa de temperatura de digestão de microondas: A rampa expressa o tempo (minutos) necessário para atingir a temperatura do passo seguinte; O tempo representa os minutos na mesma temperatura e a potência indica a potência em porcentagem utilizada para os 10 vasos	25
Figura 3.2 - Espectrofotômetro de Absorção Atômica com Forno de Grafite (PerkinElmer Instruments Analyst 700) com amostrador automático (Perkin Elmer Analyst 800)	26
Tabela 3.4 - Condições analíticas do chumbo, cádmio e manganês: Comprimento de onda, Temperatura de pirólise e Temperatura de Atomização selecionados para metais quantificados por GFAAS	26
Figura 4.1 - Curva de calibração Pb (Concentração vs Absorvância): As concentrações são apresentadas em µg / L. Cada ponto da curva representa uma média, (n=5)	34
Figura 4.2 - Curva de calibração Cd (Concentração vs Absorvância): As concentrações são apresentadas em µg / L. Cada ponto da curva representa uma média, (n=5)	35
Figura 4.3 - Curva de calibração Mn (Concentração vs Absorvância): As concentrações são apresentadas em µg / L. Cada ponto da curva representa uma média, (n=5)	35

Tabela 4.1 - Os parâmetros lineares do chumbo, cádmio e manganês: a - declive da reta; b - ordenada na origem; r^2 - coeficiente de determinação; $S_{y/x}$ - desvio padrão residual; S_{y2} - erro padrão; N - número de pontos da curva de calibração; DS^2 - diferença das variâncias; PG - valor teste; Teste F - valor tabelado da distribuição de Fisher-Snedecor com um nível de significância $\alpha = 0,01$	36
Tabela 4.2 - Gama de trabalho do cádmio, chumbo e manganês: foram analisados o primeiro e último padrão da curva de calibração. Cada valor médio é o resultado de dez medições (n = 10)	37
Tabela 4.3 - Teste de homogeneidade de variância para o chumbo, cádmio e manganês: PG - valor do teste; Teste F - valor tabelado da distribuição de Fisher-Snedecor com um nível de significância $\alpha = 0,01$	37
Tabela 4.4 - O limite de detecção e o limite de quantificação do chumbo, cádmio e manganês: LD e LQ foram calculados pelo método da curva de calibração e pela leitura de 10 brancos	38
Tabela 4.5 - Concentração dos metais ($\mu\text{g/L}$) Pb, Cd e Mn para uma amostra (A) medida 10 vezes (n=10). O Desvio Padrão Relativo para as concentrações de cada metal analisado na amostra é representado por RSD %	39
Tabela 4.6 - Valores médios de precisão intermediária para o chumbo, cádmio e manganês em três dias diferentes e os seus RSD (%): Cada valor médio de dias diferentes é o resultado de 10 medições (n = 10)	40
Tabela 4.7 - Recuperação pós digestão para a quantificação do chumbo, cádmio e manganês: A média da concentração de metal nas amostras fortificadas antes da digestão (R) é o resultado de 5 medições.....	41
Tabela 4.8 - Análise de material de referência certificado para o chumbo, cádmio e manganês: TM-24.3 e TM-26.3 foram os MRCs utilizados	42
Tabela 4.9 - Quantificação de metais ($\mu\text{g/L}$) em amostras de leite de vaca (n = 14): Os valores correspondem a uma média (n = 2).....	43
Figura 4.4 - A média da concentração Pb ($\mu\text{g} / \text{L}$) nas amostras de bebidas de soja (n = 14) é de 134 $\mu\text{g} / \text{L}$ e nas amostras de leite de vaca (n = 14) é de 193 $\mu\text{g} / \text{L}$. O desvio padrão nas amostras de bebidas de soja é de 97 $\mu\text{g} / \text{L}$ e 121 $\mu\text{g} / \text{L}$ nas amostras de leite de vaca. ($p > 0.05$)	43
Figura 4.5 - A média da concentração Cd ($\mu\text{g} / \text{L}$) nas amostras de bebidas de soja (n = 14) é de 56 $\mu\text{g} / \text{L}$ e nas amostras de leite de vaca (n = 14) é de 25 $\mu\text{g} / \text{L}$. O desvio padrão nas amostras de bebidas de soja é de 43 $\mu\text{g} / \text{L}$ e 25 $\mu\text{g} / \text{L}$ nas amostras de leite de vaca. (* $p < 0.05$). *: significa que houve uma diferença significativa com $p < 0.05$	44
Figura 4.6 - A média da concentração Mn ($\mu\text{g} / \text{L}$) nas amostras de bebidas de soja (n = 14) é de 1161 $\mu\text{g} / \text{L}$ e nas amostras de leite de vaca (n = 14) é de 58 $\mu\text{g} / \text{L}$. O desvio padrão nas amostras	

de bebidas de soja é de 316 µg / L e 12 µg / L nas amostras de leite de vaca. (* p < 0.05). *: significa que houve uma diferença significativa com p < 0.05..... 45

Tabela 4.10 - Quantificação de metais (µg/L) em amostras de bebida de soja (n = 14): Os valores correspondem a uma média (n = 2)..... 45

Tabela 4.11 - Ingestão diária de Pb pelo consumo de leite de vaca ou bebida de soja. Os valores recomendados da ingestão de leite para adultos foram adquiridos nas diretrizes dietéticas para americanos 2015-2020 (USDHHS and USDA, 2015). Os valores a negrito estão acima do limite da ingestão diária tolerável de Cd para um adulto de 65 Kg 47

Tabela 4.12 - Ingestão diária de Cd pelo consumo de leite de vaca ou bebida de soja. Os valores recomendados da ingestão de leite para adultos foram adquiridos nas diretrizes dietéticas para americanos 2015-2020 (USDHHS and USDA, 2015). Os valores a negrito estão acima do limite da ingestão diária tolerável de Cd para um adulto de 65 Kg 49

Tabela 4.13 - Ingestão diária de Mn pelo consumo de leite de vaca ou bebida de soja. Os valores recomendados da ingestão de leite foram adquiridos nas diretrizes dietéticas para americanos 2015-2020 (USDHHS and USDA, 2015), usando dados do instituto nacional do coração, pulmão e sangue (USDHHS PHS and ATSDR, 2012) para determinar a quantidade de leite adequada para crianças com idades entre os 2 a 3 e 4 a 8 anos. Os valores a negrito estão acima dos valores recomendados pela EFSA..... 51

Tabela 4.14 - Ingestão adequada de Mn, tendo em conta a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) (adaptado de EFSA, 2013). 52

Tabela 4.15 - Comparação da concentração dos metais (µg / L) Pb, Cd e Mn nas amostras de leite de vaca neste estudo com valores publicados noutros estudos: N.A. - Não Analisado no estudo referido. 53

Tabela 4.16 - Comparação da concentração dos metais (µg / L) Pb, Cd e Mn nas amostras de bebida de soja neste estudo com valores publicados noutros estudos: N.A. - Não Analisado no estudo referido 53

Tabela 7.1 - Distribuição de Fisher-Snedecor com um nível de significância $\alpha = 0,01$ 66

Figura 7.1 - Material de referência certificado TM-24.3..... 67

Figura 7.2 - Material de referência certificado TM-26.3..... 68

Lista de Abreviaturas

AAS – Espectrometria de Absorção Atômica

ADI – Ingestão Diária Aceitável

ASAE – Autoridade de Segurança Alimentar e Económica

CE – Comissão Europeia

CVG – AAS – Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Vapor Químico

DDA – Dose Diária Aconselhável

DMT1 – Transportador de Metal Divalente 1

DRVs – Valores de Referência Dietéticos

DS² – Diferença das variâncias

EFSA – Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos

EPA – Agência de Proteção Ambiental

FAAS – Espectrometria de Absorção Atômica em Chama

FDA – Food and Drug Administration

FAO – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura

GFAAS – Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite

HCL – Hollow - Cathode Lamp

IA – Ingestão Adequada

IARC – Agência Internacional de Pesquisa sobre o Cancro

ICP - MS – Espectrómetro de Massa com Plasma de Acoplamento Indutivo

JECFA – Comité Conjunto de Peritos em Aditivos Alimentares

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

MMT – Metilciclopentadienil Tricarbonil de Manganês

MRC – Materiais de Referência Certificados

NDA – Painel de Produtos Dietéticos, Nutrição e Alergias

OMS – Organização Mundial da Saúde

Painel CONTAM – Painel de peritos em Contaminantes

PCBs – Bifenilos Policlorados

POP – Poluentes Orgânicos Persistentes

PTFE – Politetrafluoroetileno

PTWI – Ingestão Semanal Tolerável Provisória

RSD – Desvio Padrão Relativo

SCOOP – Cooperação Científica a Tems relativos aos Alimentos

ST – Sólidos Totais

Teste F – Valor tabelado da distribuição de Fisher - Snedecor

UE – União Europeia

1. Introdução

1.1. Segurança Alimentar

Na Europa, as crises alimentares que emergiram a partir da década de 90 constituíram um ponto de viragem da política em matéria da defesa dos consumidores e da segurança dos alimentos. Em 1981, por exemplo, foi consumido óleo de colza industrial com anilina (síndrome do azeite tóxico em Espanha) e em 1989 e 1999, na Bélgica, houve contaminação de leite com dioxinas e de porcos e galinhas com PCBs (Bifenilos Policlorados) (DRAP Centro, 2018).

Além disso, devido ao aumento das trocas comerciais de alimentos, qualquer incidente podia rapidamente ter um impacto global (WHO/Europe, 2009).

A comissão Europeia apercebeu-se, então, da necessidade de estabelecer e de fazer cumprir normas de segurança mais rigorosas para o conjunto da cadeia alimentar (European Union, 2019).

O Livro Branco, publicado em Janeiro de 2000 sobre a segurança dos alimentos, prevê a criação de uma Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar, sublinhando a necessidade de uma harmonização dos sistemas nacionais de controlos e de os alargar às fronteiras externas da União Europeia (UE). Preconiza igualmente o estabelecimento de um diálogo permanente com os consumidores e os profissionais do sector, com vista à recuperação da confiança mútua e o colocar à disposição dos cidadãos uma informação clara e precisa sobre a qualidade, os riscos eventuais e a composição dos alimentos (DRAP Centro, 2018).

Assim, em 2002, a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) foi oficialmente criada como parte de um programa abrangente para melhorar a segurança alimentar da UE, sendo uma fonte independente de aconselhamento científico e comunicação sobre os riscos associados à cadeia alimentar (EFSA, 2002).

A política da UE em matéria de segurança e intervenção no domínio alimentar incide em quatro grandes áreas de proteção, como a higiene dos produtos alimentares, a saúde animal, a fitossanidade e os contaminantes e resíduos.

A cooperação científica em questões relacionadas aos projetos sobre Cooperação Científica em Temas relativos aos Alimentos (SCOOP), coordenado pela EFSA, é responsável por coletar dados sobre os contaminantes nos alimentos. Esses dados servem para ajudar a aplicar limites máximos aceitáveis aos alimentos para consumo humano e animal produzidos e importados na UE, de forma a haver uma vigilância dos alimentos e proteção dos consumidores (European Union, 2019).

1.2. Contaminantes

Os produtos químicos de origem antropogénica e natural entram na alimentação animal, na alimentação humana e na água como contaminantes indesejáveis ou como parte dos componentes de uma dieta (Dorne et al., 2003).

A contaminação dos alimentos pode ser de origem industrial e ambiental (a indústria produz uma enorme quantidade de produtos químicos e subprodutos que podem contaminar o ambiente, ser absorvidos pelas cadeias alimentares e contaminar os alimentos para consumo humano), de origem biológica (pode resultar de processos naturais, que envolvem a existência de toxinas produzidas pelos próprios produtos alimentares ou por outros organismos vivos) e podem resultar do processamento dos alimentos (envolve tecnologia baseada em elevadas temperaturas que podem conduzir a alterações indesejáveis nos alimentos) (Franco and Cozzolino, 2010).

Em relação à contaminação química de origem industrial e ambiental os metais pesados (chumbo, mercúrio, cádmio), os PCBs e as dioxinas do grupo dos POP (Poluentes Orgânicos Persistentes) têm sido os contaminantes mais referidos.

Relativamente aos metais pesados, o chumbo e o cádmio são dos que apresentam maiores riscos ao nível da segurança alimentar, sendo a exposição humana por via alimentar, principalmente devido ao consumo de vegetais, frutos, peixe ou marisco contaminados.

Foram estabelecidos valores limite de consumo para os aditivos e os contaminantes químicos, abaixo dos quais o risco para a saúde é ínfimo. Estes níveis de ingestão diária aceitável (ADI) e de ingestão semanal tolerável provisória (PTWI) são expressos pela quantidade em miligramas da substância química que pode ser consumida pelo Homem, sem prejuízo para a saúde, por quilograma do seu peso corporal.

A contaminação dos alimentos leva à presença de contaminantes químicos, isto é, de substâncias que não foram adicionadas intencionalmente aos alimentos, mas que estão presentes nos mesmos, como resíduos da produção, transformação, acondicionamento, transporte e conservação. Nestes incluem-se os contaminantes de origens industriais (dioxinas, metais pesados), as toxinas produzidas por organismos vivos, como fungos, algas e algumas plantas e frutos, e os contaminantes resultantes do processamento alimentar. A contaminação química, também, pode levar à presença de resíduos de pesticidas e medicamentos veterinários e produtos que migram dos materiais que se encontram em contacto com os alimentos (ASAE, 2019).

Pelos dados SCOOP de 2004 sobre níveis médios de ingestão de chumbo, mercúrio, cádmio e arsénio na dieta dos adultos em 13 países europeus (Bélgica, Dinamarca, Finlândia, França, Alemanha, Grécia, Irlanda, Itália, Holanda, Noruega, Portugal, Suécia e Reino Unido), observou-se que os níveis de ingestão de metais pesados pelos adultos foram de 10 a 30% dos níveis de PTWI, enquanto os dados sobre a ingestão entre crianças foram muito irregulares.

Estes dados irregulares devem-se ao facto das crianças consumirem mais alimentos por unidade de peso corporal do que os adultos, para além de ainda terem órgãos e tecidos a desenvolverem-se, o que faz com que sejam mais susceptíveis aos efeitos tóxicos de certos químicos (Pronczuk de Garbino J, 2005).

Para minimizar os problemas de saúde dos consumidores resultantes do consumo de alimentos contaminados, o controlo e monitorização são obrigatórios em todos os países da União Europeia (ASAE, 2019).

A avaliação do risco de produtos químicos para a saúde humana tem sido alvo de estudo por parte dos organismos internacionais de segurança alimentar, como a Comité Conjunto de Peritos em

Aditivos Alimentares (JECFA) da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) / Organização Mundial da Saúde (OMS), a Agência de Proteção Ambiental (EPA) e a Food and Drug Administration (FDA), dos Estados Unidos, a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA) e muitas autoridades nacionais, como a Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE) (Dorne et al., 2003).

1.3. Leite de vaca e bebida de soja - aspetos nutritivos e contaminantes

O leite de vaca tem vindo a ser cada vez mais substituído pelas bebidas de soja na alimentação portuguesa. Esta substituição deve-se muito à intolerância à lactose, ao consumo exagerado de produtos de origem animal e ao menor valor calórico, menor teor de gordura e inexistência de colesterol. Face a estes argumentos, as bebidas de soja parecem ser uma melhor opção. Contudo, ambos os leites apresentam características muito diferentes, pelo que só é possível tomar uma decisão consciente, tendo por base essas diferenças (Pereira et al., 2017).

A industrialização dos países faz com que os metais pesados sejam uma das contaminações mais importantes do leite e produtos lácteos. Assim, é necessário controlar a presença desses metais no leite, uma vez que este constitui um alimento de elevado consumo, principalmente em recém-nascidos e crianças (Meshref et al., 2014).

A concentração de metais tóxicos em leite não contaminado é preciso, mas o seu conteúdo pode sofrer uma variação considerável através dos processos de produção e embalagem (Ziarati et al., 2018).

Metais pesados, como o chumbo, cádmio, crómio, níquel e cobalto podem contaminar os solos e serem absorvidos pelas raízes das plantas ou poluir os lençóis freáticos e aquíferos. Os humanos e os animais ao ingerirem plantas contaminadas por esses metais pesados, podem, consequentemente, ficar contaminados com esses metais (Paganini, 2004).

1.3.1. Leite de vaca

O leite e os produtos lácteos são importantes componentes da dieta humana. Do ponto de vista nutricional, o leite é composto principalmente por água, onde são encontrados dispersos os componentes sólidos, denominados sólidos totais (ST), constituídos de proteínas, lípidos, lactose, vitaminas e minerais. É considerado uma boa fonte de proteína, por conter todos os aminoácidos essenciais, e cálcio, um dos minerais que é reduzido do consumo humano, quando o leite é excluído da alimentação. No entanto, o leite e os produtos lácteos, também, podem conter contaminantes químicos, que podem constituir um risco para a saúde do consumidor (Pereira et al., 2017; Licata et al., 2004).

Os metais presentes no leite e nos produtos lácteos podem ser agrupados em elementos essenciais (ferro, cobre, zinco, manganês, entre outros) em doses baixas, e em não essenciais, tóxicos (nomeadamente, chumbo e cádmio). A presença destes últimos, mesmo em baixas concentrações, leva a desordens metabólicas com consequências extremamente graves (Khan et al., 2008).

A dose destes elementos influencia na sua toxicidade, pelo que até os elementos essenciais podem ser tóxicos, se absorvidos acima dos limites toleráveis para um normal funcionamento dos seres vivos. Para além disso, o excesso de um elemento num organismo pode causar a deficiência de outro (s) elemento (s). Por exemplo, um excesso de chumbo no organismo interfere na absorção de cálcio, ferro, cobre e zinco (Baird, 2002; Melo et al., 2003).

Os elementos essenciais, como o ferro, cobre, zinco e manganês contribuem para muitas funções biológicas, pelo que a sua deficiência pode levar a efeitos adversos na saúde. Por outro lado, se estiverem presentes em níveis excessivos possam resultar em efeitos negativos sobre a saúde humana (Kazi et al., 2009).

O cádmio e o chumbo apesar de não serem particularmente tóxicos nas suas formas de elementos livres condensados, nas suas formas catiónicas e quando ligados a cadeias curtas de átomos de carbono, tornam-se perigosos. Estão associados à etiologia de um número de doenças do sistema cardiovascular, rins, sistema nervoso, sangue e sistema esquelético. Por isso, torna-se particularmente preocupante a existência de resíduos de Cd e Pb no leite e produtos lácteos, uma vez que são largamente consumidos por lactentes e crianças (Salah et al., 2013; Zhuang et al., 2009).

A concentração de Cd no leite tem tendência a aumentar com o avançar da idade animal. Porém, alguns estudos demonstram que as concentrações de cádmio no leite de vaca são mais altas nos animais que crescem em áreas industriais ou que consomem alimentos contaminados com metais pesados do que nos que crescem em áreas menos poluídas (Ziarati et al., 2018).

A presença de metais pesados em produtos lácteos pode ser devido à contaminação do leite primário da vaca, por sua vez exposta ao meio ambiente ou ao consumo de alimentos e água contaminados; apesar do leite não pasteurizado poder, também, ser contaminado durante a sua produção. Assim, o conteúdo de elementos no leite e produtos lácteos depende do estágio de lactação, do estado nutricional do animal, fatores ambientais e factores genéticos, práticas de fabrico e possível contaminação de equipamentos durante o processamento (Salah et al., 2013; Cashman, 2011).

Neste estudo, um dos objetivos foi analisar o leite de vaca de diversas marcas do mercado português relativamente à concentração dos metais pesados Pb e Cd e do metal essencial Mn.

1.3.2. Bebida de soja

As bebidas à base de extratos vegetais, como a soja, arroz, milho, amêndoa e castanha são chamadas também de “leites vegetais” ou bebidas vegetais. A constatação científica dos benefícios da soja, para além do reconhecido valor nutricional, aumentou o interesse pelo consumo dos grãos dessa leguminosa.

A soja foi estudada, e reconhecida em 1999 como um alimento funcional por conter um baixo valor de gorduras saturadas e colesterol, prevenindo doenças do coração, o cancro, a diabetes, a osteoporose e a obesidade (Pereira et al., 2017).

A bebida de soja é tipicamente produzida pela moagem da soja embebida em água, sendo uma das bebidas tradicionais e mais amplamente consumidas em países asiáticos, incluindo a China, Japão, Coreia, Singapura e Tailândia.

Nas últimas décadas, o consumo de produtos à base de soja tem aumentado de forma constante. Nos Estados Unidos, a percentagem de pessoas que consomem produtos de soja pelo menos uma vez por semana aumentou de 27%, em 2012, para 35%, em 2019, sendo que o produto de soja mais consumido é o “leite” de soja (Shurtleff and Aoyagi, 2019; Soyconnection.com, 2019).

Este crescimento de consumo foi em parte devido à sua aprovação pela Food and Drug Administration nos Estados Unidos, que afirma que 25 gramas de proteína de soja por dia em conjunto com uma dieta pobre em gordura saturada e colesterol podem reduzir o risco de doenças cardíacas. Outros fatores que levaram ao crescimento do consumo de bebidas de soja foram a inovação em novos produtos para atender às necessidades dos consumidores (melhorias de sabor e custos mais baixos) e a sua expansão para novas áreas (lojas de conveniência e cafés) (Anon, 2019).

Nas Diretrizes Dietéticas de 2015-2020 para os americanos estão incluídas as bebidas de soja como substituto do leite de vaca. Este documento inclui as bebidas de soja como parte do grupo dos laticínios, citando-as como uma alternativa ao leite, devido à sua similaridade na composição de nutrientes (cálcio, vitaminas A e D) e à recomendação de uma ingestão diária de bebidas/ leite de soja de duas a três chávenas por dia, dependendo dos requisitos de calorias.

O documento afirma, também, que os produtos vendidos como "leites", mas provindos de plantas, por exemplo, os leites de amêndoa, arroz, coco e cânhamo, podem ser consumidos como fonte de cálcio, apesar de não serem incluídos no grupo dos laticínios, dado o seu conteúdo nutricional geral não ser semelhante ao leite e às bebidas fortificadas de soja.

Estas diretrizes afirmam, ainda, que aqueles que são incapazes ou optam por não consumir laticínios devem consumir alimentos que forneçam os nutrientes que são habitualmente obtidos a partir do consumo de laticínios, mencionando os produtos de soja (incluindo as bebidas de soja) como alternativa (USDHHS and USDA, 2015; Thorning et al., 2016).

Em resposta a um aumento gradual no consumo de bebidas de soja, vários novos produtos foram introduzidos no mercado deste tipo de bebida. Por exemplo, o sabor a feijão característico da soja é indesejável para a maioria dos consumidores nos países ocidentais, pelo que foram introduzidas mudanças ao nível do seu sabor. No entanto, as inovações mais recentes estão focadas na produção de um "leite de soja funcional", ou seja, num leite que contém componentes bioativos extras que pode ajudar a melhorar a saúde ou a diminuir o risco de doenças (Anon, 2019).

A soja tem um importante papel na indústria alimentar, devido ao seu elevado valor proteico, mas também, porque os seus grãos são uma boa fonte de compostos fenólicos, com propriedades antioxidantes e de isoflavonas, um grupo de fitoestrogénios com a capacidade de provocar uma resposta semelhante ao estrogénio, diminuindo o risco de doenças hormonais e relacionadas com a idade, conferindo, assim, importantes benefícios para a saúde humana (Genovese et al., 2003).

No entanto, a presença de antinutrientes naturais, como inibidores de tripsina (TI), lectinas, ácidos fítics e oligossacarídeos indigestíveis, limita o seu consumo. Por esse motivo, no processo de aquecimento durante a produção convencional de bebida de soja se destroem a maior parte dos seus antinutrientes, melhorando a digestibilidade da proteína de soja. No entanto, compostos, como o ácido fítico, que interfere na disponibilidade de cálcio, não são reduzidos (Jiang et al., 2013).

Segundo Montarini (2009), a semente de soja contém, em média, 40% de proteínas, 20% de lípidos, 35% de hidratos de carbono e 5% de minerais, sendo, também, uma fonte de vitamina E, K e de vitamina B1 (tiamina), B2 (riboflavina) e B9 (ácido fólico). Dentro dos minerais, é rica em magnésio, fósforo, zinco, cobre e ferro. O seu conteúdo em cálcio é de apenas 29,3%, menor que o do leite de vaca (Tashima and Cardello et al., 2003).

Tabela 1.1 - Composição do leite de soja e do leite de vaca por 100 ml de leite (Dutra de Oliveira et al. 1982).

Componente	Leite de Soja (g)	Leite de Vaca (g)
Água	91,8	88
Proteína	3	3,6
Gordura	1,4	3
Carboidrato	3,8	4,9
Fibras	0	0
Calorias	38	61
Calcio (mg)	36	123
Fósforo (mg)	30	96
Ferro (mg)	0,4	0,1
Sódio (mg)	--	--
Vitamina A	10	Tr*
Vitamina B1	0,05	0,04
Vitamina B2	0,04	0,18
Niacina	0,2	0,1
Vitamina C	0	1

*Tr: Traços

Como podemos ver na tabela 1, o leite de soja contém uma combinação equilibrada de nutrientes, semelhante ao leite de vaca. Para além disso, pelos baixos níveis ou mesmo ausência de colesterol, glúten e lactose, torna-se uma ótima alternativa ao leite de vaca, especialmente entre alguns vegetarianos e veganos, pessoas alérgicas ao leite ou intolerantes à lactose (Jiang et al., 2013).

Segundo Bojinova et al., 1994, alimentos como a soja podem acumular mais metais pesados do que outros. Os metais pesados nos solos podem ser derivados de fontes naturais (geogénicas) e de contaminação antropogénica. O rápido desenvolvimento económico nos últimos anos de inúmeras atividades humanas, como a mineração, fundição, agricultura, tratamento de resíduos e transportes provocaram a libertação de quantidades significativas de metais pesados no meio ambiente, havendo uma maior contribuição dos metais nos solos provindos de fontes antropogénicas do que de fontes naturais (Sadraabad, 2018; Bojinova et al., 1994).

A captação de metais pesados do solo contaminado, através das raízes das plantas, pela deposição direta de contaminantes da atmosfera ou partículas do solo nas superfícies das plantas são dois dos principais contribuintes para o acumular de metais pesados na parte comestível das culturas alimentares. A ingestão de alimentos tem sido, por isso, considerada a principal via de exposição humana aos metais pesados (Bojinova et al., 1994; Zhuang et al., 2013).

Neste estudo, outro dos objetivos foi analisar a bebida de soja de diversas marcas do mercado português, relativamente à concentração dos metais pesados Pb e Cd e do metal essencial Mn.

1.4. Metais Seleccionados

Os metais são o grupo de elementos mais abundante na crosta terrestre e a sua importância toxicológica ou nutricional é diferente (Anastácio, M. et al., 2018).

São reconhecidos como essenciais à vida humana, cerca de 30 elementos. Alguns são necessários em quantidades maiores, como Ca, K, Mg e Na, enquanto outros, como Cu, Fe, Ni, Zn e Mn, desempenham um papel importante nos sistemas biológicos, uma vez que participam em inúmeros processos bioquímicos no organismo, quando a sua ingestão é a adequada. No entanto, em quantidades elevadas, esses metais são tóxicos e podem causar efeitos nocivos no organismo. Por outro lado, metais como o Pb, Cd e o Hg, elementos não essenciais são tóxicos, causando efeitos adversos mesmo quando presentes em quantidades menores (Cindrić et al., 2011).

A toxicidade dos metais manifesta-se por interromperem os processos celulares normais, levando à toxicidade em vários órgãos. Para além disso, podem acumular-se nos tecidos biológicos, processo conhecido como bioacumulação, isto porque uma vez absorvidos pelo organismo, podem ser armazenados em determinados órgãos, como o fígado e o rim, sendo, posteriormente, excretados a uma taxa lenta em comparação com a sua absorção (FSAI, 2009).

Nos últimos anos, o uso excessivo de fertilizantes e pesticidas na agricultura, a poluição ambiental e a industrialização e urbanização têm atraído a atenção pública para a contaminação da cadeia alimentar por metais pesados (Sadrabad, 2018).

Metais pesados como o cádmio, o chumbo e o mercúrio são elementos químicos que ocorrem naturalmente, através de processos naturais de erosão das formações rochosas que os libertam para o ambiente, surgindo nos solos e águas (EFSA, 2012).

Por outro lado, as atividades industriais, como a combustão industrial de carvão, as fundições e incineração de resíduos, contribuem para aumentar as emissões de metais pesados na atmosfera. Os metais pesados, por não poderem ser degradados ou destruídos, são estáveis e contaminantes persistentes no ambiente, tendo tendência a acumular-se nos solos (ASAE, 2019).

Os efeitos adversos causados na saúde pelos metais tóxicos dependem da via de exposição (inalação, oral ou dérmica), do local de exposição e da duração da exposição, podendo haver exposições agudas, subagudas, subcrónicas e crónicas (Uva and Faria, 2000; Klaassen, 2013). Após a absorção destes metais os danos por eles causados podem recair no local de contacto com o organismo ou em diversos órgãos por efeito sistémico, ou seja, quando os metais são transportados para diversos órgãos antes de exercerem um efeito adverso (figura 1.1) (Mohammadi and Ziarati, 2015).

A exposição do ser humano a esses metais pode ocorrer, por exemplo, pela ingestão de alimentos (sobretudo vegetais, frutos, peixe e marisco) e água contaminados (EFSA, 2012).

Relativamente ao cádmio e ao chumbo, a principal fonte destes metais na população em geral são os alimentos, embora o ar possa desempenhar um papel importante em áreas muito contaminadas.

O cádmio é carcinogénico e o chumbo um provável carcinogénico, estando ambos associados a várias doenças do sistema cardiovascular, rins, sistema nervoso, sangue e sistema esquelético (Ziarati, 2018).

O manganês é considerado um elemento essencial, no entanto em elevadas concentrações pode causar danos neurodegenerativos progressivos, resultando em sintomas semelhantes aos da doença de Parkinson, bem como alterar a função cardiovascular em animais e humanos (Jiang and Zheng, 2005).

Os metais seleccionados para este estudo foram o chumbo, o cádmio e o manganês, sendo as suas características e propriedades referidas nas seguintes secções.

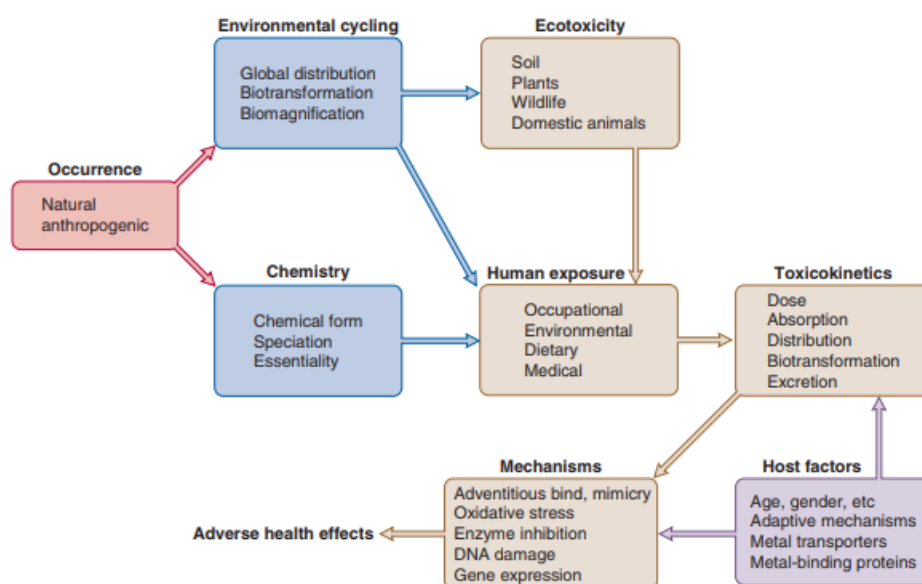


Figura 1.1 - Visão geral da toxicologia de metais (Klaassen, 2013).

1.4.1. Chumbo

O chumbo é usado pelo ser humano há pelo menos 7000 anos, porque é maleável, dúctil e fácil de extrair e fundir, apesar de ser listado como uma substância tóxica.

O chumbo metálico (Pb) é resistente à corrosão e pode-se combinar com outros metais para formar ligas em baterias, escudos de radiação, canos de água e munições. Os compostos de chumbo orgânicos existem, inicialmente, na forma divalente, podendo formar compostos Pb^{4+} que são utilizados como pigmentos em tintas, corantes, cerâmicas e esmaltes (ATSDR, 2005).

Na Europa, desde a década de 1970, foram tomadas medidas para regular os níveis de chumbo na gasolina, nas tintas e nas latas de alimentos que tiveram um efeito considerável na redução da exposição. No entanto, dada a sua persistência ambiental, permanece a preocupação de que o chumbo possa entrar na cadeia alimentar (EFSA, 2010b).

A contaminação dos alimentos com chumbo surge das emissões para o ambiente, como a mineração e o uso de gasolina com chumbo, prática, atualmente, drasticamente diminuída.

O painel de peritos em contaminantes da Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (Painel CONTAM) publicou um parecer científico em Abril de 2010 sobre os possíveis riscos da presença de chumbo nos alimentos para a saúde humana. Nesse parecer considerou-se que os cereais, os vegetais e a água potável são os alimentos que contêm mais chumbo na Europa.

Outras fontes de chumbo na dieta são os recipientes para alimentos, como as latas soldadas com chumbo e os recipientes de cerâmica com esmaltes e cristais de chumbo (FSAI, 2009).

Segundo o Painel CONTAM a exposição cumulativa de todas estas fontes não deve exceder a ingestão semanal tolerável provisória (PTWI) do chumbo de 25 μg / kg peso corporal (EFSA, 2010b).

Os Regulamentos (CE) nº 1881/2006 e nº 629/2008 da comissão citaram o limite máximo de chumbo para o leite não pasteurizado, o leite tratado termicamente e os produtos à base de leite de 20 μg /kg peso húmido e para as gorduras e óleos, incluindo a gordura do leite de 100 μg /kg peso húmido (FSAI, 2009).

Exposição

Uma das principais vias de exposição ao chumbo na população é a oral, através da ingestão de alimentos e água, apesar de, nos últimos anos, a sua ingestão dietética ter diminuído para bebés e crianças (< 5 μg por dia) (Manton et al., 2005).

Os dados do relatório SCOOP mostraram que a quantidade de chumbo nos alimentos é geralmente baixa, e que este metal pode acumular-se em peixes e crustáceos, encontrando-se em concentrações mais elevadas nas vísceras (fígado e rim). Assim, os consumidores de dietas ricas nestes alimentos, bem como de frutas e legumes podem estar expostos a quantidades elevadas de chumbo (FSAI, 2009).

Outras fontes potenciais de exposição ao chumbo são a munição de carregamento manual, solda, fabricação de jóias, cerâmica, armeiro, polimento de vidro, pintura e elaboração vitral. As ervas medicinais também podem ser fontes potenciais desta exposição. Por exemplo, certos produtos

fitoterápicos ayurvédicos foram encontrados contaminados com chumbo (variando até 37 mg / g) e mais de 55 casos de envenenamentos com chumbo foram associados à ingestão desses produtos (Levin et al., 2008; Patrick, 2006).

Para os adultos há uma menor exposição ao chumbo pelo ar, sendo a poeira doméstica e o solo as fontes de maior exposição para as crianças (ATSDR, 2005; EFSA, 2010b).

Toxicocinética

O chumbo é absorvido mais em crianças do que em adultos. Enquanto os adultos absorvem 5% a 15% do chumbo ingerido e geralmente retém menos de 5% do que é absorvido, as crianças absorvem 42% de chumbo ingerido com uma retenção de 32% (Ziegler et al., 1978). A absorção de chumbo pode ser aumentada pela baixa ingestão dietética de zinco, manganês, ferro e cálcio, particularmente em crianças (Mahaffey, 1985; Wu et al., 2011).

Apesar de haver uma menor exposição ao chumbo que é transportado pelo ar, quando partículas de chumbo do ar são inaladas, aproximadamente, 90% são pequenas o suficiente para ficarem retidas nos alvéolos, sendo absorvidas eficientemente (ATSDR, 2005).

O chumbo, depois de absorvido, é distribuído, inicialmente, para tecidos moles, como o rim e o fígado e, ao longo do tempo, para os ossos e cabelo (EFSA, 2010b). O chumbo libertado dos ossos pode contribuir até 50% do chumbo no sangue, podendo ser uma fonte significativa de exposição endógena. Por exemplo, a reabsorção óssea que se observa durante a gravidez, a lactação e a menopausa pode contribuir para uma exposição significativa ao chumbo nas mulheres (Silbergeld et al., 1993; Gulson et al., 2003).

As meias-vidas do chumbo no sangue e nos ossos são de aproximadamente 30 dias e 10-30 anos, respetivamente, e a principal via de excreção do chumbo absorvido é através do rim. A excreção renal de chumbo é feita, geralmente, através do filtrado glomerular, com alguma reabsorção tubular renal, embora a excreção fecal via trato biliar represente um terço da excreção total de chumbo absorvido (EFSA, 2010b; ATSDR, 2005).

Toxicidade

A toxicidade do chumbo é um problema de saúde pública nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, devido aos efeitos adversos que pode causar nos humanos, dependendo da dose ou duração da sua exposição (Goyer, 1990).

A exposição aguda e crónica ao chumbo pode causar muitos efeitos sistemáticos deletérios, incluindo a hipertensão, anemia, défices cognitivos, infertilidade, desequilíbrios imunológicos, atraso no desenvolvimento dentário esquelético, deficiência de vitamina D e efeitos gastrointestinais. Apesar de ainda não terem sido descobertos completamente os mecanismos subjacentes para esses efeitos sistémicos, a causa mais plausível é o dano induzido por radicais livres. Além disso, o chumbo sendo um catião divalente pode substituir o cálcio, afetando, consequentemente, várias vias de sinalização celular (Mitra et al. 2017).

O chumbo é um dos químicos mais perigosos para as crianças, sendo o sistema nervoso central o mais afetado, enquanto nos adultos, os efeitos cardiovasculares (hipertensão) e a nefrotoxicidade (neuropatia periférica e nefropatia crónica) são as maiores preocupações (Klaassen, 2013). Como nas crianças o efeito da exposição ao chumbo, a longo prazo, é a neurotoxicidade, durante o período dos 2 aos 3 anos de idade, aumenta o risco de transtornos mentais, défice de atenção e

hiperatividade, devido ao importante desenvolvimento do sistema nervoso central, nestas idades (EFSA, 2010b).

1.4.2. Cádmio

O cádmio (Cd) é um metal de transição tóxico descoberto em 1817 como uma impureza da “calamina” (carbonato de zinco), sendo classificado de uma substância tóxica principal, tal como o chumbo.

Este metal é encontrado, maioritariamente, em minérios com outros metais, e é produzido comercialmente como um subproduto do zinco e chumbo fundidos, considerados fontes de cádmio ambiental. Aproximadamente, 75% do cádmio produzido é utilizado em baterias (especialmente as de níquel - cádmio), para além de ser usado em soldas como estabilizador do plástico e pigmento para tintas, plásticos e ligas de galvanização, devido às suas propriedades não corrosivas (Nordberg et al., 2007; ATSDR, 2008).

Em 2009, o Painel CONTAM da EFSA realizou uma avaliação de risco do cádmio nos alimentos, estabelecendo um PTWI de 2,5 µg / kg de peso corporal.

Em 2011, após uma avaliação pelo Comité Conjunto de Especialistas em Aditivos Alimentares da FAO / OMS (JECFA), o Painel CONTAM reavaliou o PTWI do cádmio e reafirmou as suas conclusões anteriores de que é improvável que ocorram efeitos adversos num indivíduo com exposição ao cádmio na dieta, apesar de existir necessidade de reduzir a sua exposição ao nível da população (EFSA, 2012).

Atualmente, pelo Painel CONTAM o PTWI adequada para o Cádmio é de 2,5 µg /kg (EFSA, 2011). Os Regulamentos (EC) n°1881/2006 e n° 629/2008 da comissão citaram o limite máximo de cádmio para as bebidas de soja de 200 µg /kg peso húmido (FSAI, 2009).

Exposição

Para a população no geral não fumante, a principal fonte de exposição ao cádmio são os alimentos. As concentrações mais altas de cádmio são encontradas nos rins e fígados de mamíferos e em mexilhões, ostras e vieiras. Alguns cogumelos selvagens, também, podem conter elevadas concentrações de cádmio, tal como o arroz cultivado em certas áreas geológicas onde o solo é rico neste metal (Järup et al., 1998).

No entanto, estes géneros alimentícios são menores contribuintes para a ingestão total de cádmio, dado serem consumidos em quantidades relativamente pequenas e os dados analisados pelos projetos SCOOP indicarem a baixa probabilidade da população da UE exceder a DDA (dose diária aconselhável) do cádmio. No entanto, ao longo dos anos houve um aumento da quantidade de cádmio nos vegetais, devido à contaminação do solo por fontes naturais e antropogénicas, como as emissões industriais, alguns fertilizantes e uso de água para irrigação contendo cádmio (FSAI, 2009).

O marisco acumula concentrações elevadas de cádmio (100 – 200 µg/kg), o fígado e o rim de animais podem ter concentrações superiores a 50 µg/kg e o tabaco e os cereais (arroz, trigo) contêm concentrações de 10 a 150 µg/kg (Satarug and Moore, 2004).

Uma importante fonte de exposição ao cádmio por via inalatória é o tabaco. A planta do tabaco tem a capacidade de absorver o cádmio dos solos e de o concentrar nas folhas. Um fumador terá uma inalação adicional de 1 a 3 µg de cádmio por cada maço de cigarros que fume. Esses valores são semelhantes à quantidade ingerida através da dieta, pelo que a inalação diária de cádmio de um indivíduo que fume um maço de cigarros por dia é sensivelmente o dobro do de um não fumador. Consequentemente, as concentrações de cádmio no sangue em indivíduos fumadores são superiores aos dos não fumadores (Fernandes et al., 2006).

Toxicocinética

A absorção de cádmio é geralmente maior após a sua inalação, variando de 10 a 60%, dependendo do composto, local de deposição e tamanho da partícula. Por exemplo, 50% do cádmio que provém do fumo do cigarro pode ser absorvido através dos pulmões (Satarug and Moore, 2004).

A absorção de cádmio pode ser aumentada por deficiências alimentares em cálcio ou ferro e dietas pobres em proteína. Na maior parte dos casos, as mulheres têm concentrações de cádmio superiores aos dos homens no sangue, possivelmente devido às mulheres em idade fértil terem reservas de ferro relativamente baixas, provocando o aumento da absorção do cádmio (Ryu et al., 2004).

A relação entre o metabolismo e a toxicidade do cádmio é representada na figura 1.2. O cádmio é transportado no sangue pela ligação à albumina e outras proteínas de maior peso molecular. Sendo principalmente depositado no fígado e em menor concentração no rim.

No fígado, rim e outros tecidos, o cádmio induz a síntese de metalotioneína (MT), uma proteína de baixo peso molecular que se liga a metais como o cádmio e o ferro (Klaassen et al., 1999). O Cádmio é armazenado no fígado principalmente como cádmio - MT, que pode ser libertado e transportado via sanguínea para o rim, onde é reabsorvido nos túbulos e degradado nos lisossomas do rim, provocando a libertação de cádmio para formação de mais complexo cádmio - MT ou toxicidade renal (Klaassen, 2013).

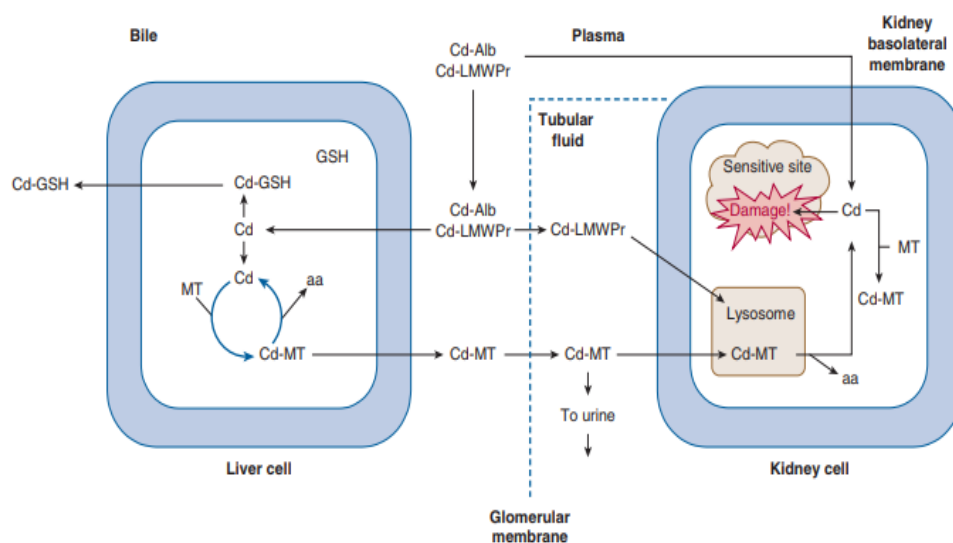


Figura 1.2 - Transporte de cádmio, ligação de proteínas e toxicidade. GSH, glutatona; MT, metalotioneína; aa, aminoácidos; Cd-Alb, Cd-albumina; Cd-LMWPr, Cd associado a proteínas de baixo peso molecular (Klaassen, 2013).

Aproximadamente, 50 a 75 % do cádmio é encontrado no fígado e nos rins e estima-se que a sua meia-vida seja na faixa dos 10 aos 30 anos (Nordberg et al., 2007).

Ao nível da excreção, apenas 0,001% do cádmio absorvido é excretado por dia (Satarug and Moore, 2004; ATSDR, 2008). No entanto, como o cádmio é nefrotóxico, quando existe uma patologia renal, a sua excreção urinária é aumentada, devido a uma diminuição da absorção renal de cádmio filtrado (Zalpus and Ahmad, 2003).

Toxicidade

A toxicidade aguda induzida pela ingestão de elevadas concentrações de cádmio, através das bebidas ou alimentos, provoca uma irritação grave no epitélio do sistema gastrointestinal, como vômitos, diarreia e dor abdominal; embora, atualmente, seja raro acontecer uma toxicidade aguda provocada pela ingestão de elevadas concentrações de cádmio em humanos (Klaassen, 2013). Por exemplo, a doença do *itai – itai* que ocorre no Japão, é provocada pela toxicidade do cádmio em combinação com deficiências nutricionais, nomeadamente de zinco e cálcio, que levam a uma má formação dos ossos nesses doentes. No entanto, observa-se que os doentes com *itai – itai* têm uma dieta em que a ingestão de cádmio está dentro dos limites toleráveis provisórios (Satarug and Moore, 2004).

A toxicidade aguda do cádmio depende da solubilidade dos compostos de cádmio. Por exemplo, exposições agudas por inalação de cloreto de cádmio, óxido de etileno e carbonato são mais solúveis e, consequentemente, são mais tóxicos do que os sulfetos menos solúveis. A inalação de elevadas concentrações de cádmio na forma de vapores ou compostos de materiais aquecidos pode levar ao surgimento de pneumonias agudas com edema, podendo mesmo ser letal (ATSDR, 2008; Klimisch, 1993).

A maior parte do cádmio acumula-se em tecidos como o fígado e os rins, causando ao longo do tempo, anemia, doença pulmonar obstrutiva, osteoporose e doenças cardiovasculares. Os efeitos

tóxicos crônicos do cádmio são mais preocupantes do que as raras exposições tóxicas agudas, porque os pacientes cronicamente expostos ao cádmio têm danos renais, perturbações ao nível do fósforo e do metabolismo do cálcio, para além de aumentar o risco de virem a ter cálculos nos rins.

A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Cancro (IARC) classifica o cádmio como um agente cancerígeno do grupo 1 (carcinogénico para os humanos), sendo o cancro nos pulmões e na próstata a principal preocupação em grupos ocupacionalmente expostos (Klaassen, 2013).

1.4.3. Manganês

O manganês é o 12º metal mais abundante da crosta terrestre, sendo classificado como um metal essencial e imprescindível para muitas funções metabólicas e celulares, como a regulação da glicose no sangue e energia celular, reprodução, digestão, crescimento ósseo, coagulação sanguínea e hemostasia e defesa contra espécies reativas de oxigénio.

Os efeitos benéficos do manganês devem-se à sua função de cofator para várias reações enzimáticas, incorporando enzimas como o arginase, glutamina sintetase, fosfoenolpiruvato descarboxilase e superóxido dismutase (SOD) de manganês (Aschner et al., 2007; Aschner et al., 2005; Aschner and Erikson, 2017).

Atualmente, há uma expansão no uso industrial do manganês. Na indústria de siderurgia é utilizado como componente das ligas usadas na soldagem (por exemplo, as ferroligas).

O organismo é capaz de adaptar-se a uma ampla gama de ingestão de manganês, regulando a eficiência da absorção no intestino e quantidade excretada via biliar (Klaassen, 2013).

A Comissão Europeia pediu ao Painel de Produtos Dietéticos, Nutrição e Alergias (NDA) que estabelecesse Valores de Referência Dietéticos (DRVs) para o manganês. No entanto, como não há evidências suficientes disponíveis para derivar um valor de referência na ingestão de manganês, é proposta uma ingestão adequada (IA), apresentado na tabela 1.2. A ingestão média de manganês para adultos, incluindo mulheres grávidas e lactentes, é de, aproximadamente, 3 mg / dia. Enquanto, para crianças dos 7 aos 11 meses é proposto uma IA de 0,02 – 0,5 mg / dia, que reflete a ampla variedade de concentrações de manganês que parecem adequadas para consumo nessa faixa etária (EFSA, 2013).

Tabela 1.2 - Resumo da ingestão adequada de manganês (EFSA, 2013).

Age	Adequate intake (mg/day)
7–11 months	0.02–0.5 ^(a)
1–3 years	0.5
4–6 years	1.0
7–10 years	1.5
11–14 years	2.0
15–17 years	3.0
≥ 18 years ^(b)	3.0

(a) Tendo em conta a ampla variedade de concentrações de manganês que parecem ser adequadas para consumo, é estabelecida uma faixa para a IA dessa faixa etária.

(b) Incluindo mulheres grávidas e lactentes.

Exposição

Os alimentos são a principal fonte de ingestão do manganês. A maioria provém dos grãos integrais (gérmen de trigo, aveia e farelo), arroz e nozes, embora o chocolate, o chá, os mexilhões, o marisco, os legumes, as frutas, as sementes (linho, gergelim, abóbora, girassol e pinhão) e as especiarias (pimenta em pó, cravo e açafrão) também sejam ricos neste metal.

As fábricas de ligas de aço de manganês, bobinas elétricas, baterias, vidro e varas de solda e a produção de permanganato de potássio (KMnO₄) podem contribuir para uma exposição ocupacional a elevadas concentrações de manganês (Crossgrove and Zheng, 2004).

As exposições ambientais a este metal são associadas a pesticidas organometálicos, como o maneb e o mancozeb. E recentemente, tem havido um aumento no interesse da toxicologia dos aditivos nos combustíveis contendo Metilciclopentadienil Tricarbonil de Manganês (MMT) e dos compostos de manganês (por exemplo, o mangafodipir), e como intensificadores de ressonância magnética em técnicas de imagem clínica (Crossgrove and Zheng, 2004; ATSDR, 2008).

Toxicinética

As interações entre manganês e ferro interferem na toxicocinética do manganês, uma vez que podem competir pela mesma proteína de ligação no soro (transferrina) e nos mesmos sistemas de transporte (DMT1) (Roth and Garrick, 2003).

O manganês encontra-se em maiores concentrações nos tecidos com um elevado número de mitocôndrias, como o pâncreas, fígado, rins e intestino. Podendo, também, acumular-se em regiões cerebrais específicas, devido à sua facilidade em atravessar a barreira hematoencefálica (Crossgrove and Zheng, 2004).

Do manganês que é ingerido, apenas, 1 a 5 % é absorvido e a sua principal via de excreção são as fezes, após a sua reabsorção no intestino através da biliar. A excreção biliar é pouco desenvolvida

em crianças recém-nascidas, havendo um aumento do manganês no cérebro e noutros tecidos (Roth and Garrick, 2003; Aschner et.al, 2005).

Toxicidade

A exposição ao manganês pode alterar a função cardiovascular em animais e humanos, dilatando os vasos sanguíneos e induzindo hipotensão, apesar do cérebro ser o órgão mais sensível ao manganês e poder ocorrer o surgimento do manganismo (neurotoxicidade crónica induzida pelo manganês) (Guilarte, 2010; Jiang and Zheng, 2005).

O manganismo está associado a concentrações elevadas de manganês no cérebro, principalmente em zonas com elevadas concentrações de ferro não - heme, como a *substantia nigra*. As interações entre o manganês e o ferro são muito importantes na toxicidade do manganês. A co-acumulação de ferro com manganês no *globus pallidus* permite que o ferro contribua para a perda de células neuronais. A exposição crónica ao manganês altera as concentrações de ferro no sangue e líquido cefalorraquidiano, provavelmente devido à interação ferro-manganês em certas proteínas contendo ferro-enxofre que regulam a homeostase do ferro (Aschner et al., 2005; Aschner et al., 2007; Roth and Garrick, 2003; Crossgrove and Zheng, 2004).

O manganismo gera sintomas como a dor de cabeça, insónias, perda de memória e instabilidade emocional que ao evoluir pode provocar contrações musculares prolongadas (distonia), diminuição do movimento muscular (hipocinesia), rigidez, tremor de mãos e distúrbios da fala (Crossgrove and Zheng, 2004; Aschner et al., 2005).

A principal fonte de exposição ocupacional ao manganês é o ar, sendo frequente o manganismo em trabalhadores expostos a aerossóis que contém concentrações extremamente elevadas de manganês ($> 1 - 5 \text{ mg Mn / m}^3$). Embora, essa neurotoxicidade, também, possa ser devida à ingestão de substâncias contaminadas com manganês (Klaassen, 2013).

1.5. Métodos de determinação de metais

Para determinar a quantidade de metais pesados podem ser usados diferentes métodos, que incluem a Espectrometria de Absorção Atómica, Voltametria, Potenciometria, Eletroforese Capilar, Espectrometria de Emissão Atómica com Plasma de Acoplamento Indutivo, Análise por Injeção em Fluxo e a Espectrometria de Fluorescência Atómica.

Um método muito utilizado para a determinação de metais é o da Espectrometria de Absorção Atómica (AAS), devido à sua sensibilidade e menor custo comparativamente com outras técnicas. Apesar da Espectrofotometria de Massa com Plasma de Acoplamento Indutivo (ICP-MS) ter um campo de aplicação maior e apresentar uma maior sensibilidade do que a AAS, tem a desvantagem de um custo mais elevado e uma operação mais complexa, pelo que a sua seleção deve ser objetivamente justificada (Ziarati et al., 2018).

1.5.1. Digestão das amostras

O método de preparação de amostras é uma etapa de extrema importância na análise do leite e bebidas de soja. O leite consiste numa mistura complexa de hidratos de carbono, proteínas e lípidos que não são completamente solúveis em água ou em solventes orgânicos. Por isso, são usados métodos de digestão de amostra para decompor a matéria orgânica e libertar os metais da matriz da amostra (Korn et al., 2008).

A maioria dos procedimentos de digestão usados envolve o uso de agentes oxidantes fortes, como o HNO_3 . Estes permitem a decomposição da matriz orgânica da amostra e a libertação e solubilização dos analitos em análise de forma a evitar a perda de elementos - alvo e a haver um melhor rendimento analítico (Lamble and Hill, 1998; Cindrić et al., 2011).

Apesar do uso de um método de digestão adequado seja um pré-requisito crucial para uma análise precisa, a digestão das amostras é uma das etapas mais demoradas e também uma das principais fontes de contaminação num procedimento analítico (Lamble and Hill, 1998).

A digestão por microondas foi iniciada por Abu Samra et al. em 1975. Desde então, tornou-se uma técnica cada vez mais popular para a preparação de amostras antes da análise de metais, sendo, nos estudos recentes, o método selecionado para a digestão ácida de muitas amostras de alimentos, em alternativa a outros procedimentos clássicos de digestão, como as cinzas húmida e seca (Abu-Samra et al., 1975; Berghof, 2014).

A digestão ácida pode ser realizada em sistemas de pressão abertos ou fechados. Neste estudo, foi utilizada a técnica de digestão por microondas em vasos fechados. A vantagem da digestão em sistema fechado em comparação com a digestão em sistema aberto reside nas temperaturas de trabalho significativamente mais altas que podem ser alcançadas, enquanto em sistemas abertos as temperaturas são limitadas pelo ponto de ebulição do ácido em solução (Lamble and Hill, 1998).

As amostras digeridas por microondas são aquecidas diretamente pela absorção da radiação de microondas, permitindo um aquecimento simultâneo rápido. As temperaturas mais altas dão origem a um aumento na cinética da reação, que por sua vez diminui o tempo de digestão, permitindo que seja concluído mais rapidamente (Korn et al. 2008; Berghof, 2014).

O equipamento usado neste estudo (Berghof, Speedwave Two) permite que a temperatura de cada amostra seja medida em tempo real e sem contato. Cada vez que o prato giratório gira, todas as temperaturas da amostra são registadas separadamente e a intensidade da radiação é ajustada de acordo com a temperatura medida. Este controlo constante da temperatura no interior de cada vaso garante a segurança, curvas de aquecimento reproduzíveis e, conseqüentemente, resultados de digestão também mais reproduzíveis (Berghof, 2014).

Geralmente, as amostras devem ser introduzidas no espectrofotómetro de absorção atómica na forma líquida e sem a presença de qualquer matéria orgânica. A digestão ácida, por microondas, permite a transferência dos analitos para a solução e a decomposição da matriz, evitando a perda ou contaminação dos analitos dentro do tempo mínimo de manuseio. Para este processo é usado uma grande variedade de reagentes, como os ácidos nítrico (HNO_3) e clorídrico (HCL), peróxido

de hidrogénio (H_2O_2), sulfato de potássio (K_2SO_4) e ácido bórico (H_3BO_3). Esses reagentes devem ser selecionados de acordo com a amostra a ser digerida (Marques et al., 2017; Lamble and Hill, 1998).

Os ácidos concentrados fazem com que os valores do branco sejam elevados e causem um aumento excessivo da pressão nos vasos de digestão. Quando ácidos oxidantes fortes (como o H_2SO_4 ou HClO_4) são usados, o aumento da pressão interna pode até exceder o nível de tolerância de alguns sistemas de digestão. Outro fator crítico ao uso de ácido concentrado é o das amostras digeridas requererem diluição antes da determinação dos seus analitos para evitar a deterioração do equipamento analítico (Wong et al., 1997).

Em alternativa, a digestão com ácidos diluídos é uma técnica mais segura e aplicada com sucesso na determinação de uma série de elementos em vários estudos. Outras vantagens do seu uso são uma grande redução na contaminação de metais com traços de metais, uma redução de ácidos concentrados como efluentes de laboratório, os desvios-padrão serem mais baixos e o não serem necessários elevados fatores de diluição das amostras antes da medição dos seus analitos. Apesar do poder oxidante dos ácidos diluídos ser mais fraco do que o dos ácidos concentrados, os ácidos diluídos podem absorver mais energia de microondas, devido à existência de uma maior quantidade de água em solução que torna a digestão da amostra mais eficiente (Bizzi et al., 2010; Gonzalez et al., 2009; Wong et al., 1997).

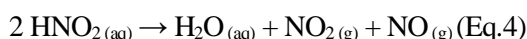
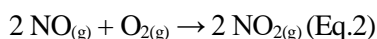
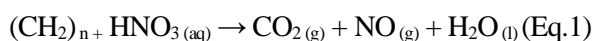
Neste estudo foi usado ácido nítrico diluído.

O ácido nítrico é usado com frequência em processos de decomposição de amostras, por ser associado a uma manipulação simples, fácil purificação e eficiência na oxidação de compostos orgânicos presentes em amostras biológicas.

Os diferentes óxidos hidrossolúveis que podem ser produzidos com a decomposição térmica do ácido nítrico são NO , NO_2 , NO_3^- , N_2O , N_2O_3 , N_2O_4 , N_2O_5 , N_2O_6 , HNO e HNO_2 , com características oxidantes. O NO que é volatilizado a partir da solução aquecida reage com o O_2 na fase gasosa presente no vaso de digestão. Consequentemente, é gerado o gás NO_2 que é reabsorvido na solução.

Assim, ocorre uma reação que leva à formação de NO_3 e NO , repetindo-se até esgotar todo o O_2 na fase gasosa dentro do vaso fechado.

As reações que se dão dentro do vaso de digestão são as seguintes:



Os vasos usados podem ter volume para conter oxigénio suficiente que promova a regeneração do ácido nítrico, através das reações apresentadas acima (Bizzi et al., 2010; Gonzalez et al., 2009; Bizzi et al., 2011).

Uma das vantagens da técnica de digestão por microondas em sistema fechado é a elevada eficiência de aquecimento. No entanto, o excesso de pressão durante a digestão das amostras com elevado conteúdo orgânico, pode levar a uma rutura dos vasos selados. Pelo que a maioria das bombas de digestão é equipada com válvulas de alívio de pressão, projetadas para abrir quando a pressão se torna muito alta e, assim, permitir a segurança do procedimento.

A amostra é ainda pré-digerida antes do início do método de digestão por microondas, para que os gases produzidos a partir da decomposição da matéria orgânica facilmente oxidada escapem e haja uma menor pressão (Lamble and Hill, 1998).

A outra vantagem do método utilizado é a necessidade reduzida de reagentes. A rápida dissolução, minimiza o consumo de ácido e, conseqüentemente, o risco de contaminação da amostra e a perda de elementos voláteis, sendo, por isso, considerada uma técnica simples e de baixo custo.

Uma limitação deste equipamento é o tempo necessário para a pré-digestão e o arrefecimento (depois da digestão concluída e antes da abertura dos vasos) (Korn et al., 2008).

1.5.2. Espectrometria de Absorção Atômica

A espectrometria de absorção atômica (AAS) é uma das técnicas mais utilizadas para quantificação de metais, sendo de aplicação muito mais ampla. Pode utilizar três processos diferentes de atomização: Espectrometria de Absorção Atômica em Chama (FAAS), Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite (GFAAS) e Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Vapor Químico (CVG-AAS). No entanto, a escolha da técnica ideal é determinada pela composição química da amostra e o seu estado físico (Amorim et al., 2008; Perkin Elmer, 2013a).

A Espectrometria de Absorção Atômica é uma técnica na qual os átomos gasosos livres absorvem a radiação eletromagnética de um comprimento de onda específico para produzir um sinal que é proporcional à concentração desses átomos absorventes livres no percurso ótico. Para isso, é necessária uma fonte de radiação (lâmpada catódica) que emite as linhas atômicas nítidas do elemento a ser determinado (Amorim et al., 2008).

A fonte de radiação mais utilizada na Espectrometria de Absorção Atômica é a lâmpada de HCL. Esta lâmpada consiste num cátodo cilíndrico oco (contendo o elemento de interesse no seu interior) e num ânodo, estando ambos dentro de um tubo de vidro fechado, preenchido com um gás inerte, geralmente de néon ou de argon.

A aplicação de uma diferença de potencial na lâmpada permite a formação de iões Ar que colidem com o cátodo, levando à excitação dos átomos do analito. Através destas colisões, os átomos do analito são excitados e emitem radiação com o comprimento de onda característico do elemento, aquando relaxam para o seu estado fundamental. Assim, a lâmpada de cátodo oco fornece uma radiação característica do elemento de interesse (Fernández, 2018).

No atomizador, que pode ser um sistema de chama ou elétrico em forno de grafite, é introduzida a amostra para que se gere um vapor atômico sobre o qual incidirá o feixe de luz que vem da fonte. De seguida, o monocromador é usado para dispersar os vários comprimentos de onda da radiação emitidos pela fonte e para isolar a linha de interesse. O comprimento de onda da radiação

que é isolado pelo monocromador é direcionado para o detector. Normalmente, o detetor é um tubo fotomultiplicador que produz uma corrente elétrica (dependente da intensidade da luz) que é processada por um processador de sinal. (Fernández et al., 2018; Beaty and Kerber, 1993).

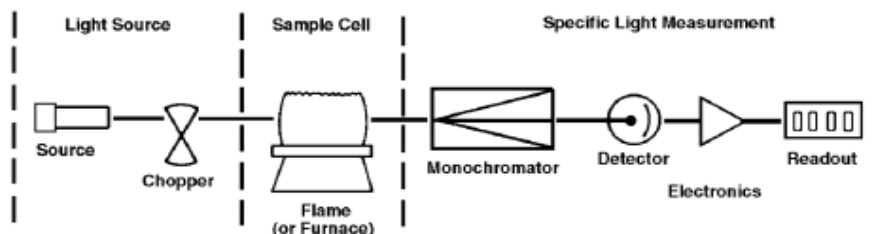


Figura 1.3 - Espectrómetro de absorção atômica básico de feixe único (adaptado de Beaty and Kerber, 1993).

Os benefícios da utilização da AAS são o baixo custo e o permitir uma deteção rápida e fácil, sendo um dos métodos mais utilizados na medição dos metais pesados no leite (Ziarati et al., 2018).

Neste estudo foi utilizada a técnica de Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite (descrita abaixo) com lâmpadas de cátodo oco (HCL), específicas para cada elemento, para a quantificação de Cd, Pb e Mn nas amostras de leite selecionadas.

1.5.2.1. Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite

Na Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite (GFAAS) a amostra é introduzida diretamente num tubo de grafite que é aquecido numa série programada de etapas para remover o solvente e os principais componentes da matriz de forma a atomizar a amostra restante. O analito é, então, atomizado e os átomos são retidos dentro do tubo (local de passagem da radiação proveniente da fonte de radiação) por um tempo superior ao da chama (alguns segundos). Como resultado, possui uma maior sensibilidade e limites de deteção geralmente de 100 a 1000 vezes melhores do que a Espectrometria de Absorção Atômica em Chama (FAAS).

A GFAAS, para além de analisar mais de 40 elementos, e apresentar um baixo consumo de amostra (poucos microlitros), permite também analisar soluções aquosas, líquidos viscosos e sólidos (Holcombe and Borges, 2010; Perkin Elmer, 2013a).

Na GFAAS, o forno de grafite permite a eliminação da matriz, cuja presença pode diminuir a performance analítica, e a atomização da amostra que ocorre em etapas distintas, através de um programa de temperatura do forno.

Mesmo com etapas distintas podem ocorrer perdas de analito na etapa de pirólise ou interferências causadas pela presença de concomitantes da amostra ainda não eliminados na etapa de atomização (Froes et al., 2006).

A modificação química é uma prática comum em determinações por GFAAS cuja função é aumentar a estabilidade térmica do analito, diminuindo a sua volatilidade e perda durante o pré-tratamento térmico e/ou a eficiência da etapa de pirólise pelo aumento da volatilização dos componentes da matriz. Os modificadores químicos permitem a aplicação de temperaturas mais altas de pré-tratamento para uma melhor remoção da matriz antes da etapa da atomização, para que se elimine as interferências provocadas pela matriz ou concomitantes presentes na amostra.

Assim, os modificadores químicos podem atuar de duas formas: combinando-se com o analito, aumentando a sua estabilidade térmica ou combinando-se com a matriz, aumentando a sua volatilidade (Froes et al., 2006; Perkin Elmer, 2013b).

No entanto, os modificadores podem apresentar alguns problemas para as análises de amostras, causando interferência espectral. Estes podem exigir o uso de uma temperatura de atomização mais alta, que pode levar a uma redução na massa característica do analito provocada pela maior taxa de difusão no tubo. Além disso, o analito pode condensar em regiões frias do tubo de grafite. Os modificadores de matriz mais comuns são o nitrato de magnésio (usado neste estudo para o Mn), dihidrogeno fosfato de amônio e hidrogenofosfato diamônio, nitrato de níquel e nitrato de paládio isoladamente ou em combinação (Bader, 2011).

2. Objetivos

Este trabalho teve como objetivo geral avaliar a contaminação por metais pesados, Pb, Cd e Mn, em leites de vaca e em bebidas de soja, comercializadas no mercado Português.

Os objetivos específicos consistiram:

- Na otimização e validação de métodos de digestão e de métodos analíticos para a determinação de metais nas matrizes referidas;
- Na comparação de leites de vaca com bebidas de soja no que concerne a níveis de Pb, Cd e Mn;
- Tirar ilações respeitantes à segurança para o consumidor, dos produtos analisados em termos de exposição a estes metais, com base nas ingestões diárias toleráveis estabelecidas/recomendadas por agências reguladoras;
- Comparar as concentrações dos metais Pb, Cd e Mn nos leites de vaca e bebidas de soja com dados semelhantes de estudos publicados por outros autores.

3. Material e Métodos

3.1. Caracterização das amostras

Foram selecionados e recolhidos no total 28 leites de vaca e bebidas de soja, de diferentes marcas do mercado português, entre Fevereiro e Maio de 2019, de forma a quantificar a sua concentração em cádmio, chumbo e manganês, os metais selecionados.

Tabela 3.1 – Tipos de bebidas selecionadas para o estudo: cada amostra é designada por uma letra de A a β ; as amostras foram agrupadas de acordo com o tipo de bebida, em que cada amostra representa uma marca diferente de bebida.

Amostras	Tipo
A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N	Leite de vaca
O, P, Q, R, S, T, U, V, W, X, Y, Z, α , β	Bebida de soja

3.2. Reagentes

Solução de Ácido Nítrico (HNO_3) 67%; Normaton, for trace metal analysis
Peróxido de Hidrogénio (H_2O_2) 30%; AnalaR Normapur, for traces analysis
Água desionizada 18,2 M Ω .cm
Modificador de Nitrato de Magnésio ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$) 2% Mg; SCP Science
Solução Padrão de Manganês (1g/L)
Solução Padrão de Chumbo (1g/L)
Solução Padrão de Cádmio (1g/L)

3.3. Material e equipamento

Para evitar qualquer possível contaminação extra de metais, todo o material usado foi mantido 24 horas numa solução de HNO_3 (15%). Após este período, o material foi lavado 3 vezes com água desionizada a 18,2 M Ω cm, seco e armazenado num local protegido do pó.

Tabela 3.2 - Material e equipamento utilizados na preparação das amostras e nos métodos de análise.

Equipamento	Marca
Sistema de purificação de água	Direct-Q UV3, Millipore – Bedford
Digestor de Microondas	Berghof Speedwave Two
Espectrofotómetro de Absorção Atómica	PerkinElmer Instruments Analyst 700 equipado com corrector de fundo de deutério
Amostrador Automático de Forno de Grafite	Perkin Elmer Analyst 800
Câmaras de Grafite com plataforma L'vov	PerkinElmer
Lâmpada de Chumbo ($\lambda = 283,3$ nm)	Lâmpada Catódica – PerkinElmer
Lâmpada de Cádmió ($\lambda = 228,8$ nm)	Lâmpada Catódica – PerkinElmer
Lâmpada de Manganês ($\lambda = 279,5$ nm)	Lâmpada Catódica – PerkinElmer

3.4. Preparação das amostras

Antes da quantificação dos metais, foi realizado um procedimento de digestão por microondas (Berghof Speedwave Two) (figura 3.1) de modo a obter uma digestão total num curto intervalo de tempo, evitando a perda de metais por volatilização e minimizando a quantidade de ácido adicionado.

O procedimento de digestão foi o seguinte: medir 0,5 mL da amostra num vaso de digestão de politetrafluoroetileno (PTFE-Teflon), adicionar 6 mL de ácido nítrico 2N e 1 mL de peróxido de hidrogénio 30%. De seguida, as amostras foram mantidas à temperatura ambiente durante 3h para garantir sua homogeneização e digestão lenta. Por fim, os vasos foram fechados e o programa de digestão foi realizado com o programa de temperatura apresentado na tabela 3.3.



Figura 3.1 - Digestor de microondas (Berghof Speedwave Two): Equipamento usado para a digestão das amostras. Este modelo tem capacidade para 10 vasos.

Tabela 3.3 - Programa de temperatura de digestão de microondas: A rampa expressa o tempo (minutos) necessário para atingir a temperatura do passo seguinte; O tempo representa os minutos na mesma temperatura e a potência indica a potência em porcentagem utilizada para os 10 vasos.

Etapa	1	2	3	4	5
Rampa (min)	10	5	0	2	0
Tempo (min)	10	15	10	15	0
Temperatura (°C)	170	200	200	100	75
Potência (%)	90				

Todos os vasos de PTFE-Teflon foram deixados fechados durante a noite para arrefecimento. No dia seguinte, o conteúdo de cada vaso foi transferido para um balão volumétrico de 15 mL. Para garantir perdas mínimas de amostra, os vasos foram lavados três vezes com água desionizada. Após este passo, as soluções incolores resultantes foram diluídas com água desionizada até completar os 15 mL do balão volumétrico e transferidas para tubos para serem posteriormente analisadas por GFAAS.

3.5. Quantificação dos metais

As quantificações de Cd, Pb e Mn nas amostras foram realizadas por Espectrometria de Absorção Atômica (PerkinElmer Instruments Analyst 700) com amostrador automático de Forno de Grafite (Perkin Elmer Analyst 800) (representado na figura 3.2).

Primeiramente, ligou-se o equipamento de GFAAS e a intensidade da lâmpada do cátodo (uma para cada metal) até esta ficar estável, depois, criou-se a curva de calibração, seguida pela análise das amostras.

Para a análise dos metais Pb e Cd não se diluíram as amostras digeridas, devido às suas concentrações nas amostras de leite de vaca e leite de soja serem baixas. No entanto, para a análise do Mn foi necessário diluir as amostras de leite de Soja digeridas, por conterem elevadas concentrações de Mn.

Para a análise do Mn nas amostras de leite de vaca, leite de soja e solução padrão foi, ainda, adicionado modificador de nitrato de magnésio ($Mg(NO_3)_2$) 2% Mg.

O programa de temperatura usado para a quantificação de cada metal é apresentado na tabela 3.4.



Figura 3.2 - Espectrofotômetro de Absorção Atômica com Forno de Grafite (PerkinElmer Instruments Analyst 700) com amostrador automático (Perkin Elmer Analyst 800).

Tabela 3.4 - Condições analíticas do chumbo, cádmio e manganês: Comprimento de onda, Temperatura de pirólise e Temperatura de atomização selecionados para metais quantificados por GFAAS.

Metal	Comprimento de onda (nm)	Temperatura de pirólise (° C)	Temperatura de atomização (° C)
Pb	283,3	1100	1600
Cd	228,8	850	1650
Mn	279,5	1400	2200

3.6. Método de Validação

A validação é uma etapa importante em todo procedimento analítico, pois é uma maneira dos laboratórios demonstrarem que os seus métodos internos de ensaio levam a resultados credíveis. Como os métodos de ensaio são geralmente associados a erros de manipulação cumulativos (sistemáticos e/ou aleatórios) que podem alterar significativamente os resultados finais, é essencial que os laboratórios possuam critérios uniformizados que permitam a obtenção de resultados com a qualidade pretendida (RELACRE, 2000).

O processo de validação incorpora o estudo de parâmetros por meio de uma avaliação direta e indireta. Neste estudo, a determinação desses parâmetros para cada metal foi realizada de acordo com o “Guia Relacre 13 - Validação de métodos internos de ensaio em análise química”.

3.6.1. Avaliação Indireta

A validação indireta é feita pela determinação e evidência dos seus parâmetros característicos (linearidade, gama de trabalho, limiares analíticos, precisão, especificidade/ seletividade, recuperação pós-digestão).

3.6.1.1. Linearidade

A linearidade pode ser avaliada por um modelo estatístico, de acordo com a norma ISO 8466-1. A calibração, na análise quantitativa, indica a relação entre uma resposta de um sistema de medição com uma substância de concentração conhecida.

Num método analítico, a linearidade da curva de calibração utilizada deverá ser sempre avaliada através da sua representação gráfica, juntamente com a análise do seu coeficiente de correlação (R^2).

Neste estudo, as curvas de calibração foram realizadas para cada metal, cada vez que se fazia uma série de análises. Foram preparadas uma série de soluções padrão com concentrações conhecidas do elemento a ser quantificado. Uma curva de calibração foi estabelecida (sinal vs concentração) e a concentração do elemento nas amostras foi determinada por interpolação.

A partir de uma curva de calibração, podem ser calculadas funções de calibração linear e não linear, usando um conjunto de pares ordenados e os respectivos desvios padrão residuais, $S_{y/x}$ e S_{y2} .

A diferença das variâncias (DS^2) é dada pela equação:

$$3.1. DS^2 = (N - 2) \cdot S_{y/x}^2 - (N - 3) \cdot S_{y2}^2$$

em que o N corresponde ao número de padrões de calibração.

O valor de teste PG é calculado por:

$$3.2. PG = DS^2 / S^2_{y2}$$

Este valor de PG é comparado com o valor tabelado da distribuição Fisher-Snedecor:

- Se $PG \leq F$: a função de calibração é linear.
- Se $PG > F$: a função de calibração não é linear.

3.6.1.2. Gama de trabalho

Na gama de trabalho, devem estar incluídos os valores padrão de calibração.

Para modelos de calibração lineares recomenda-se a norma ISO 8466-1, em que são recomendados cinco a dez pontos de calibração, igualmente distribuídos na gama de trabalho. Os primeiro e último padrões são analisados 10 vezes, de forma independente.

A gama de trabalho pode ser analisada através do teste de homogeneidade das variâncias, calculando as variâncias associadas ao primeiro e ao último padrão (S^2_1 e S^2_{10}):

$$3.3. S^2_i = \sum_{j=1}^{10} (y_{i,j} - \bar{y}_i)^2 / n_i - 1$$

Onde:

$$3.4. \bar{y}_i = \sum_{j=1}^{10} y_{i,j} / n_i$$

Para $i=1$ e $i=10$.

Onde:

i - Número padrão (neste caso vai de 1 a 10);

j - Número de repetição para cada padrão.

As variâncias são testadas para analisar se existem diferenças significativas entre elas, calculando-se o valor do teste PG:

$$3.6. PG = S^2_{10} / S^2_1$$

Quando $S^2_{10} > S^2_1$

$$3.7. PG = S^2_1 / S^2_{10}$$

Quando $S^2_1 > S^2_{10}$

O valor do teste de PG é, então, comparado com o valor tabelado da distribuição de Fisher-Snedecor, para n-1 graus de liberdade:

- Se $PG \leq F$: as diferenças de variância não são significativas e a faixa de trabalho está bem ajustada.
- Se $PG > F$: as diferenças de variância são significativas e a faixa de trabalho deve ser reduzida até que a diferença entre as variâncias em relação ao primeiro e último padrão permita que se obtenha $PG \leq F$.

3.6.1.3. Limiares analíticos

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade medida a partir do qual é possível detetar a presença do analito com alguma certeza estatística. Corresponde à mais pequena quantidade de substância a ser analisada que pode ser detetada numa amostra, mas não quantificada como um valor exato. É de referir que um resultado inferior ao limite de detecção não significa ausência do analito a medir. Em termos qualitativos, LD corresponde à concentração mínima que é possível distinguir do branco, ou seja, de uma amostra com a mesma matriz, mas sem analito.

Neste estudo, como o método de quantificação envolve uma calibração linear, o limite de detecção pode ser obtido por meio da seguinte equação:

$$3.7. LD = [3, 3. S_{y/x}] / b$$

Onde:

- $S_{y/x}$ é o desvio padrão residual da curva de calibração;
- b é o declive da mesma.

Em caso geral, o LD é calculado pela seguinte equação:

$$3.8. LD = X_0 + 3, 3 \sigma_0$$

Onde:

- X_0 é a média aritmética do conteúdo medido de uma série de brancos ou padrões vestígio (entre 10 e 20 leituras), preparados de forma independente e analisados ao longo de vários dias de trabalho;

- σ_0 representa o desvio padrão associado a X_0 .

O limite de quantificação (LQ) corresponde à menor concentração medida, a partir da qual é possível quantificar o analito, com exatidão e precisão aceitáveis. Geralmente corresponde ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco).

Neste estudo, como o método de quantificação envolve a utilização de uma calibração linear, o LQ pode ser obtido através da seguinte equação:

$$3.9. LQ = [10 \cdot S_{y/x}] / b$$

No entanto, em caso geral, o LQ é determinado por:

$$3.10. LQ = X_0 + 10\sigma_0$$

3.6.1.4. Precisão

A precisão pretende avaliar a dispersão dos resultados entre ensaios independentes repetidos numa mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. Geralmente, a precisão difere de acordo com a gama de concentrações. Para avaliar esta dispersão existem dois métodos extremos, denominados por repetibilidade e reprodutibilidade. Existe, ainda, um método intermediário, entre eles, designado por precisão intermediária.

A repetibilidade expressa a precisão de um método de ensaio executado em condições idênticas. Essas condições, realizadas em ensaios de uma mesma amostra, devem ser as mais estáveis quanto possível, tais como: o mesmo laboratório, mesmo analista, mesmo equipamento, mesmos reagentes e curtos períodos de tempo. De forma a definir a repetibilidade de um método no próprio Laboratório, realizam-se uma série de análises sobre uma mesma amostra ou padrões ($n \geq 10$), em condições de repetibilidade.

Neste estudo, a repetibilidade foi estudada analisando 10 vezes uma amostra (A) para cada um dos metais em análise.

A reprodutibilidade refere-se à precisão de um método realizado em diferentes condições (como laboratórios diferentes, operadores diferentes, equipamentos diferentes e dias diferentes), utilizando a mesma técnica e a mesma amostra.

A precisão intermediária é uma precisão avaliada sobre uma mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em outros, mas define as condições a variar, como: analistas diferentes, equipamentos diferentes, dias diferentes, com / sem verificação de calibração. Esta medida de precisão é a mais representativa da variabilidade dos resultados num laboratório, sendo a medida mais recomendada. Para determinar a precisão intermediária, sobre a amostra, são realizadas n medições em réplica, em duplicado ou em ensaio único, nas condições pré-definidas.

Neste estudo, a precisão intermediária foi obtida anteriormente no laboratório, analisando-se 10 vezes o primeiro padrão de calibração da curva de calibração de cada metal, em 3 dias não consecutivos. Foi selecionada a concentração mais baixa para este cálculo por ser a mais sensível a pequenas variações.

3.6.1.5. Especificidade/ Seletividade

A seletividade de um método é a capacidade de identificar e distinguir um analito em particular numa mistura complexa sem interferências de outros componentes.

A especificidade de um método verifica-se quando é possível discriminar o analito de outras substâncias que possam estar presentes na amostra analisada. Por isso, é necessário analisar uma amostra complexa (multi-componente) para comprovar que não há interferências de outras substâncias eventualmente presentes na amostra.

Neste estudo, a seletividade do método foi avaliada, tendo em conta os valores obtidos anteriormente em laboratório, por meio da análise do material de referência certificado (MRC), que contém uma ou mais características com valores bem estabelecidos por um processo tecnicamente válido.

3.6.1.6. Estudo da variação do método de digestão

Para estimar a ocorrência de possíveis interferências na quantificação dos metais analisados devido apenas ao procedimento de digestão das amostras por microondas, foi realizado um estudo sobre a variação do método de digestão, através da recuperação pós digestão. Este estudo foi realizado em cinco vasos com uma amostra (A) e o mesmo programa de temperatura de digestão (apresentado na tabela 3.3). Os volumes de amostra, HNO_3 e H_2O_2 foram os já referidos, tendo sido, ainda, adicionado 1000 μL de soluções padrão Pb e Mn e 200 μL de solução padrão Cd.

3.6.2. Avaliação Direta

A avaliação direta pretende determinar a exatidão dos métodos de ensaio, sendo definido como a concordância entre o resultado experimental e o valor de referência aceite como convencionalmente verdadeiro.

O termo exatidão, quando é aplicado a uma série de resultados experimentais, implica uma combinação de componentes de erros aleatórios e erros sistemáticos.

Os Materiais de Referência Certificados (MRC) devem ser usados para avaliar a exatidão de um método de ensaio, assim, como de ensaios interlaboratoriais e testes comparativos. Um MRC possui um valor de concentração e uma incerteza associada para cada elemento, e a sua aquisição deve ser feita por meio de uma entidade fornecedora reconhecida e credível.

Neste estudo, a avaliação direta foi calculada tendo em conta os valores obtidos anteriormente no laboratório.

O uso adequado destes materiais de referência certificados reside na sua análise para avaliar o desempenho do laboratório, em que o valor obtido experimentalmente de um MRC deve ser comparado com o valor certificado, calculando o erro e exatidão da análise. Quando o valor obtido não estiver dentro dos valores de incerteza indicados para o valor certificado, o Laboratório deve procurar as causas desse desvio e tentar excluí-las ou aceitá-las. De acordo com o rigor definido para os resultados, o laboratório pode adotar diversos critérios para aceitar os resultados do MRC. Para avaliar os resultados do MRC recorre-se a alguns processos, como: o erro relativo, teste de hipóteses (teste t), fator de desempenho Z (“Z-score”) e erro normalizado.

O teste utilizado anteriormente no nosso laboratório foi o fator de desempenho, que é calculado por meio da seguinte equação (“Z-score”):

$$3.11. Z = (X_{lab} - X_v) / S$$

Onde:

X_{lab} – Valor obtido em Laboratório;

X_v – Valor certificado por MRC;

S – Unidade de desvio.

A avaliação pode ser feita de acordo com a seguinte escala de classificação:

- $|Z| \leq 2$ – Satisfatório.

- $2 < |Z| \leq 3$ – Questionável.

- $|Z| > 3$ – Incorreto.

3.7. Tratamento Estatístico

Os gráficos e o tratamento estatístico, incluindo a ANOVA: fator único com um nível de significância $\alpha = 0,05$, foram realizados com as ferramentas do Excel Microsoft 365.

4. Resultados e discussão

4.1. Validação do Método

4.1.1. Avaliação Indireta

4.1.1.1. Linearidade

A linearidade foi verificada usando curvas de calibração para o Pb, Cd e Mn, os metais analisados. Cada resultado é a média de duas medições.

De forma a facilitar a apresentação dos resultados são apresentadas nas figuras 4.1, 4.2 e 4.3 (em baixo) as curvas de calibração para cada metal analisado. Cada curva foi realizada com cinco pontos.

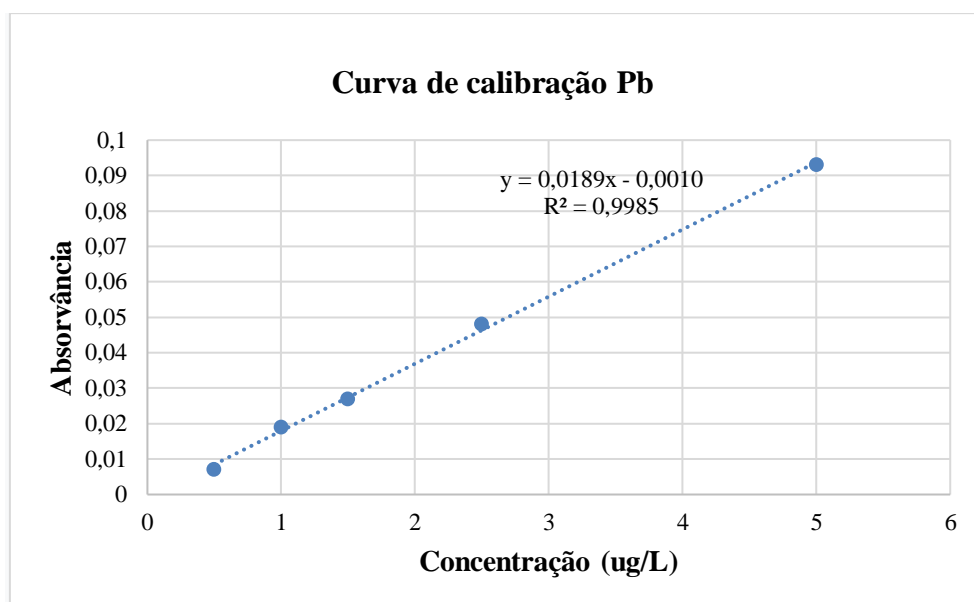


Figura 4.1 - Curva de calibração Pb (Concentração vs Absorvância): As concentrações são apresentadas em $\mu\text{g/L}$. Cada ponto da curva representa uma média.

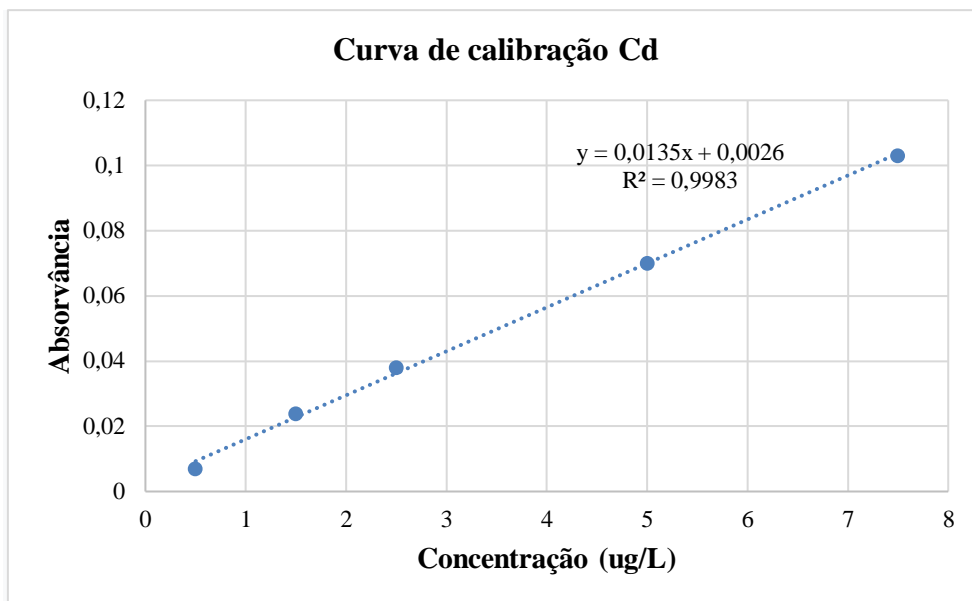


Figura 4.2 - Curva de calibração Cd (Concentração vs Absorvância): As concentrações são apresentadas em $\mu\text{g} / \text{L}$. Cada ponto da curva representa uma média.

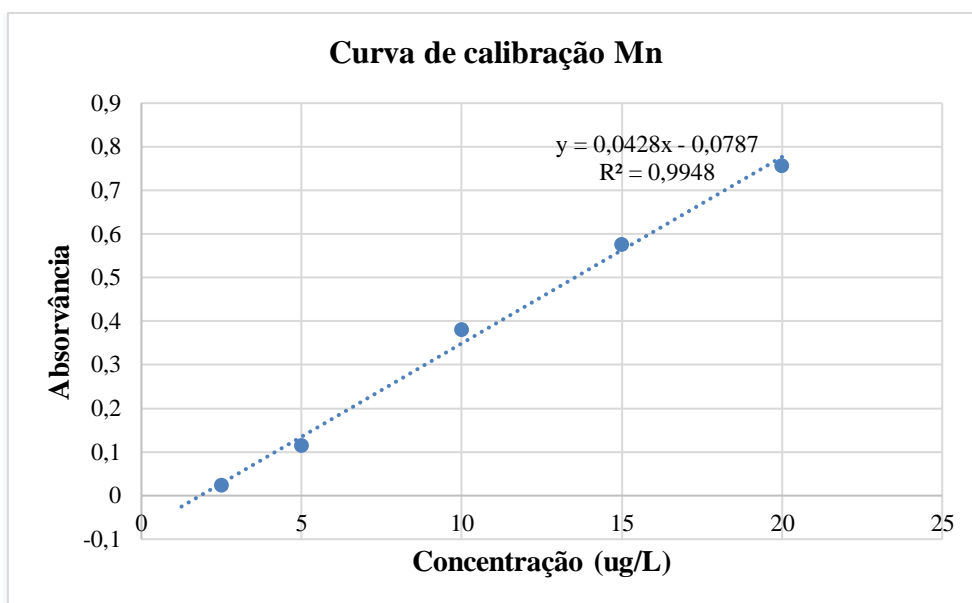


Figura 4.3 - Curva de calibração Mn (Concentração vs Absorvância): As concentrações são apresentadas em $\mu\text{g} / \text{L}$. Cada ponto da curva representa uma média.

A **Tabela 4.1** apresenta os parâmetros lineares para cada metal analisado.

Tabela 4.1 – Os parâmetros lineares do chumbo, cádmio e manganês: a - declive da reta; b - ordenada na origem; r^2 - coeficiente de determinação; $S_{y/x}$ - desvio padrão residual; S_{y^2} - erro padrão; N - número de pontos da curva de calibração; DS^2 - diferença das variâncias; PG - valor teste; Teste F - valor tabelado da distribuição de Fisher-Snedecor com um nível de significância $\alpha = 0,01$.

Metais	Pb	Cd	Mn
a	0,0189	0,0135	0,0428
b	- 0,0010	0,0026	- 0,0787
r^2	0,9985	0,9983	0,9948
$S_{y/x}$	2,8863	4,3278	15,9571
S_y^2	1,2908	1,9355	7,1362
N	5	5	5
DS^2	21,6597	48,7064	662,0363
PG	12,9995	13,0175	13
Teste F (1;0,99;n-3)	98,5030	98,5030	98,5030
Linearidade	Confirmada	Confirmada	Confirmada

A linearidade das curvas de calibração dos metais estudados é comprovada, se os valores do PG forem menores ($PG < F$) do que o valor tabelado da distribuição de Fisher-Snedecor.

Como podemos observar na tabela 4.1 a linearidade dos metais é confirmada, uma vez que para cada metal $PG < F$.

4.1.1.2. Gama de trabalho

Os valores dos padrões da calibração devem estar incluídos na gama de trabalho. Por isso, foram analisados o primeiro e último padrão 10 vezes, de forma independente. Os resultados, bem como o desvio padrão relativo, são apresentados na tabela 4.2 e foram anteriormente obtidos no laboratório, nas mesmas condições analíticas utilizadas neste trabalho.

Tabela 4.2 – Gama de trabalho do cádmio, chumbo e manganês: foram analisados o primeiro e último padrão da curva de calibração. Cada valor médio é o resultado de dez medições (n = 10).

Metais	Curva de calibração das soluções padrão	Absorvância		Concentração (µg/L)	
		Média	RSD (%)	Média	RSD (%)
Pb	5 µg/L	0,02	2,61	4,16	2,63
	25 µg/L	0,09	1,74	25,43	1,73
Cd	1 µg/L	0,14	5,40	0,88	5,53
	5 µg/L	0,89	2,10	5,65	2,11
Mn	5 µg/L	0,13	3,37	5,14	3,32
	25 µg/L	0,86	1,93	22,41	1,93

As séries de análises apresentaram um desvio padrão relativo inferior a 5%, com exceção do primeiro padrão de calibração de cádmio.

De forma a verificar se a gama de trabalho foi bem ajustada, realizou-se um teste de homogeneidade de variância para cada metal, onde o valor do teste de PG foi comparado com o valor tabelado da distribuição de Fisher-Snedecor. Os resultados encontram-se na tabela 4.3 e foram obtidos anteriormente no laboratório.

Tabela 4.3 - Teste de homogeneidade de variância para o chumbo, cádmio e manganês:

PG - valor do teste; Teste F - valor tabelado da distribuição de Fisher-Snedecor com um nível de significância $\alpha = 0,01$.

Metais	Pb	Cd	Mn
PG	0,108	0,153	0,071
Teste F	0,187	0,187	0,187
Gama de Trabalho	Bem ajustado	Bem ajustado	Bem ajustado

Conforme indicado na Tabela 4.3 o valor do teste PG é menor que o valor tabelado da distribuição Fisher-Snedecor, o que significa que a gama de trabalho está bem ajustada para todos os metais analisados.

4.1.1.3. Limiares analíticos

O LD e o LQ para os metais Pb, Cd e Mn foram calculados pelo método da curva de calibração (Equações 3.7. e 3.9.) e pela leitura de 10 brancos (Equações 3.8. e 3.10.).

Os resultados obtidos são apresentados na tabela 4.4, tendo os valores (do método da curva de calibração e leitura de 10 brancos) sido obtidos anteriormente no laboratório, com as mesmas condições analíticas utilizadas nas nossas determinações.

Tabela 4.4 – O limite de detecção e o limite de quantificação do chumbo, cádmio e manganês: LD e LQ foram calculados pelo método da curva de calibração e pela leitura de 10 brancos.

Metais		Pb	Cd	Mn
LD ($\mu\text{g/L}$)	Método da curva de calibração	0,77	0,29	1,38
	Leitura de 10 brancos	0,16	0,47	1,41
LQ ($\mu\text{g/L}$)	Método da curva de calibração	2,33	0,89	4,17
	Leitura de 10 brancos	0,31	0,69	3,65

Ao observar a tabela 4.4 verificamos que para todos os metais analisados, o LQ é menor que o primeiro ponto da curva de calibração correspondente, quando calculado pelo método da curva de calibração.

Em relação ao cálculo através dos 10 brancos, o LQ tem um valor abaixo do primeiro ponto da curva de calibração correspondente para todos os metais analisados.

Assim, pode ser demonstrado que todas as concentrações mais baixas das soluções dos padrões são quantificáveis.

4.1.1.4. Repetibilidade

Para avaliar a repetibilidade do método usado no Laboratório efetuaram-se 10 medições de uma mesma amostra (A), em condições de repetibilidade. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 4.5.

Tabela 4.5 – Concentração dos metais ($\mu\text{g/L}$) Pb, Cd e Mn para uma amostra (A) medida 10 vezes ($n=10$). O Desvio Padrão Relativo para as concentrações de cada metal analisado na amostra é representado por RSD %.

Amostras	Concentração dos Metais ($\mu\text{g/L}$)		
	Pb	Cd	Mn
A1	7,01	1,56	16,06
A2	5,97	1,41	15,57
A3	6,94	1,22	15,36
A4	5,59	1,52	16,06
A5	2,23	1,58	14,39
A6	3,11	1,25	16,62
A7	2,83	1,35	13,67
A8	3,52	1,46	13,78
A9	2,93	1,37	15,17
A10	4,21	1,19	16,33
RSD (%)	40,44	10,20	6,84

O RSD (%) para cada metal analisado na amostra A é superior a 10% para o Pb (~ 40 %), ligeiramente superior para o Cd (~10 %), e inferior para o Mn (aproximadamente, 7 %). Pode-se, assim, afirmar que este estudo possui condições aceitáveis de repetibilidade, sendo maiores para o Mn, seguido do Cd e por último o Pb.

4.1.1.5. Precisão intermediária

A precisão intermediária foi determinada ao analisar 10 vezes o primeiro padrão de calibração de cada curva de calibração dos metais, em 3 dias não consecutivos. Foi selecionada a menor concentração por ser de todas as concentrações a mais crítica. Os resultados da análise são apresentados na tabela 4.6 e foram anteriormente obtidos no laboratório.

Tabela 4.6 - Valores médios de precisão intermediária para o chumbo, cádmio e manganês em três dias diferentes e os seus RSD (%): Cada valor médio de dias diferentes é o resultado de 10 medições (n = 10).

Metais	Pb (µg/L)	Cd (µg/L)	Mn (µg/L)
Média Dia 1	4,29	0,88	5,28
Média Dia 2	4,16	0,78	5,14
Média Dia 3	4,32	0,85	4,82
Média	4,26	0,84	5,08
RSD (%)	2,05	6,59	4,66

Ao observar a tabela 4.6, verifica-se que o desvio padrão relativo é inferior a 10% para cada metal, indicando que a precisão intermediária é aceitável para todos os elementos analisados.

4.1.1.6. Especificidade / Seletividade

Se for possível discriminar um analito de outras substâncias que possam estar presentes na amostra analisada, o método é considerado específico. Dado os MRCs conterem uma mistura complexa de substâncias e ser possível distinguir e quantificar o analito de interesse dessa mistura (como é observado na tabela 4.8), a especificidade/seletividade do método pode ser afirmada.

4.1.1.7. Estudo da variação do método de digestão

O estudo da variação do método de digestão foi feito através de uma recuperação pós digestão que seguiu o mesmo programa de temperatura de digestão apresentado na tabela 3.3. Nos cinco vasos usados adicionou-se uma amostra (A), HNO₃ e H₂O₂, nas mesmas quantidades usadas para esta técnica e soluções padrão de Pb, Cd e Mn, de forma a fortificar as amostras antes da digestão. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 4.7.

Tabela 4.7 – Recuperação pós digestão para a quantificação do chumbo, cádmio e manganês: A média da concentração de metal nas amostras fortificadas antes da digestão (R) é o resultado de 5 medições.

Amostras	Concentração dos Metais (µg/L)		
	Pb	Cd	Mn
R1	14,33	4,47	12,73
R2	9,67	2,73	13,17
R3	11,94	2,21	13,73
R4	11,20	1,73	14,88
R5	9,40	1,73	14,48
Média (µg/L)	11,30	2,60	13,80
RSD (%)	17,76	44,19	6,46

Pelos resultados acima apresentados, é possível afirmar que as quantificações de Pb, Cd e Mn sofreram possíveis interferências. Pode-se concluir que se observou uma maior variabilidade para o Cd e menor para o Mn.

4.1.2. Avaliação Direta

A avaliação direta pretende determinar a exatidão do método de análise. Neste estudo, os valores para a avaliação direta, obtidos anteriormente no laboratório, foram avaliados através de materiais de referência certificados adquiridos de uma entidade fornecedora reconhecida e confiável (Environment Canada).

Na tabela 4.8, em baixo, são apresentadas para cada metal a análise dos MRCs utilizados e a sua avaliação.

Tabela 4.8 - Análise de material de referência certificado para o chumbo, cádmio e manganês: TM-24.3 e TM-26.3 foram os MRCs utilizados.

Metais	Valor certificado (µg/L)	Valor experimental (µg/L)	Z-score
Pb	5,82 ± 0,45 (TM-24.3)	6,48	1,47
Cd	3,97 ± 0,37 (TM-24.3)	4,22	0,68
Mn	17 ± 1,4 (TM-26.3)	14,26	1,95

Ao analisar a tabela 4.8, observa-se que os valores experimentais, obtidos anteriormente no laboratório, estão dentro do intervalo de valores esperados, uma vez que o respectivo Z-score é inferior a 2, valor considerado satisfatório.

4. 2. Quantificação e comparação das concentrações dos metais Pb, Cd e Mn nas diferentes marcas de leite de vaca e bebida de soja

Após a otimização das condições para digestão da amostra e quantificação de metais, todas as amostras foram analisadas por GFAAS para os metais em estudo, conforme explicado nas secções 1.5.2.1 e 3.5.

Nas tabelas 4.9 e 4.10 são apresentadas as concentrações médias (µg/L) dos metais Pb, Cd e Mn para as amostras de leite de vaca e de bebida de soja, respetivamente, resultado de duas medições independentes.

Tabela 4.9- Quantificação de metais ($\mu\text{g/L}$) em amostras de leite de vaca ($n = 14$): Os valores correspondem a uma média ($n = 2$).

Amostras	Metais ($\mu\text{g/L}$)		
	Pb	Cd	Mn
A	303	42	71
B	398	68	89
C	399	89	72
D	56	7	56
E	97	20	67
F	122	14	66
G	251	23	54
H	95	9	50
I	67	20	54
J	159	12	52
K	156	13	47
L	297	17	51
M	237	7	46
N	67	6	55

Tabela 4.10 - Quantificação de metais ($\mu\text{g/L}$) em amostras de bebida de soja ($n = 14$): Os valores correspondem a uma média ($n = 2$).

Amostras	Metais ($\mu\text{g/L}$)		
	Pb	Cd	Mn
O	417	156	1266
P	214	59	1219
Q	173	113	1065
R	171	115	1354
S	80	64	1779
T	69	30	1042
U	54	9	1773
V	62	39	861
W	182	31	1104
X	99	44	963
Y	119	32	723
Z	103	33	1223
α	78	48	1086
β	61	17	797

Ao observar as tabelas 4.9 e 4.10, identificam-se diferenças significativas nas concentrações de Pb, Cd e Mn entre as diversas marcas de leite de vaca e bebidas de soja.

Nas amostras de leite de vaca, as concentrações de Pb encontram-se entre os valores 100 e 400 $\mu\text{g/L}$, exceto nas amostras D, com 56 $\mu\text{g/L}$, E, com 97 $\mu\text{g/L}$, H, com 95 $\mu\text{g/L}$, I, com 67 $\mu\text{g/L}$.

L e N, com 67 $\mu\text{g} / \text{L}$. As amostras B e C, são as que contém uma maior concentração de Pb igual a 398 $\mu\text{g} / \text{L}$ e 399 $\mu\text{g} / \text{L}$, respetivamente.

Nas amostras de bebida de soja os teores de Pb são abaixo ou igual a 214 $\mu\text{g} / \text{L}$ nas amostras P, Q, R, S, T, V, W, X, Y, Z, α e β , com exceção da amostra O que tem uma concentração de 417 $\mu\text{g} / \text{L}$, superior à de todas as outras amostras de leite de vaca e de bebida de soja analisadas. A amostra U é a que tem a menor concentração de Pb, com o valor de 54 $\mu\text{g} / \text{L}$.

As concentrações de Cd nas amostras de leite de vaca encontram-se situadas entre os 6 $\mu\text{g} / \text{L}$ e os 23 $\mu\text{g} / \text{L}$, exceto nas amostras A, B e C que possuem valores maiores, 42, 68 e 89 $\mu\text{g} / \text{L}$, respetivamente.

No entanto, nas amostras de bebida de soja as concentrações de Cd são superiores às do leite de vaca, encontrando-se entre os valores 30 e 156 $\mu\text{g} / \text{L}$. Existem duas exceções para as amostras U, com 9 $\mu\text{g} / \text{L}$ e β , com 17 $\mu\text{g} / \text{L}$ que têm concentrações inferiores às restantes amostras. A amostra O, com 156 $\mu\text{g} / \text{L}$ é a que tem uma maior concentração de Cd, em relação a todas as outras amostras de bebida de soja e leite de vaca.

Ao nível da concentração do Mn, as amostras de leite de vaca têm concentrações compreendidas entre os 46 $\mu\text{g} / \text{L}$ e os 89 $\mu\text{g} / \text{L}$. Em contrapartida, as amostras de bebida de soja possuem teores maiores de Mn e acima dos 1000 $\mu\text{g} / \text{L}$, com exceção das amostras V, X, Y e β que possuem valores inferiores, 861, 963, 723 e 797 $\mu\text{g} / \text{L}$, respetivamente.

A amostra S (bebida de soja) é a que contém o maior teor de Mn dentro de todas as amostras analisadas, com 1779 $\mu\text{g} / \text{L}$ e a amostra M (leite de vaca), a que contém o menor teor de Mn, com 46 $\mu\text{g} / \text{L}$.

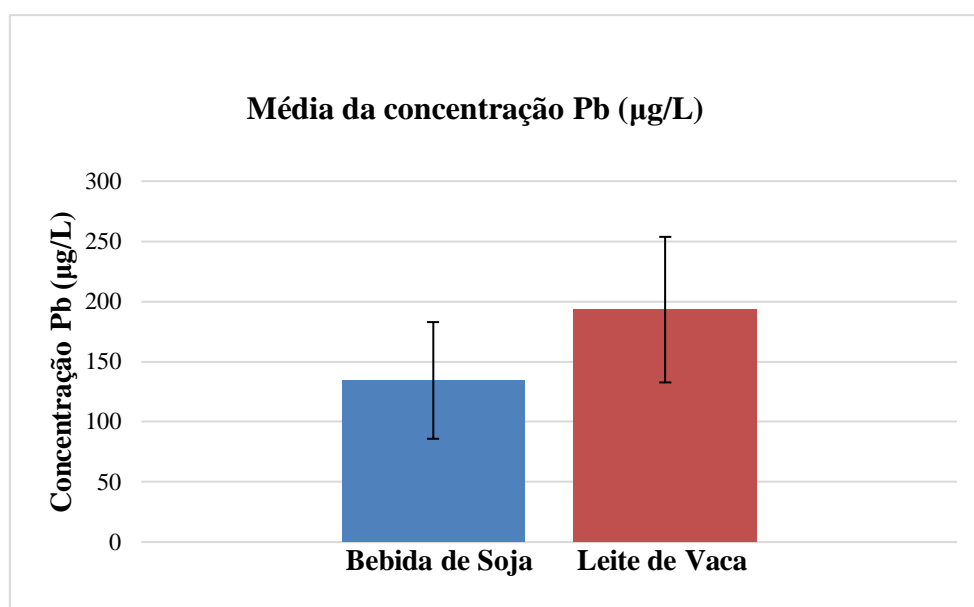


Figura 4.4 - A média da concentração Pb ($\mu\text{g} / \text{L}$) nas amostras de bebidas de soja ($n = 14$) é de 134 $\mu\text{g} / \text{L}$ e nas amostras de leite de vaca ($n = 14$) é de 193 $\mu\text{g} / \text{L}$. O desvio padrão nas amostras de bebida de soja é de 97 $\mu\text{g} / \text{L}$ e 121 $\mu\text{g} / \text{L}$ nas amostras de leite de vaca. ($p > 0.05$).

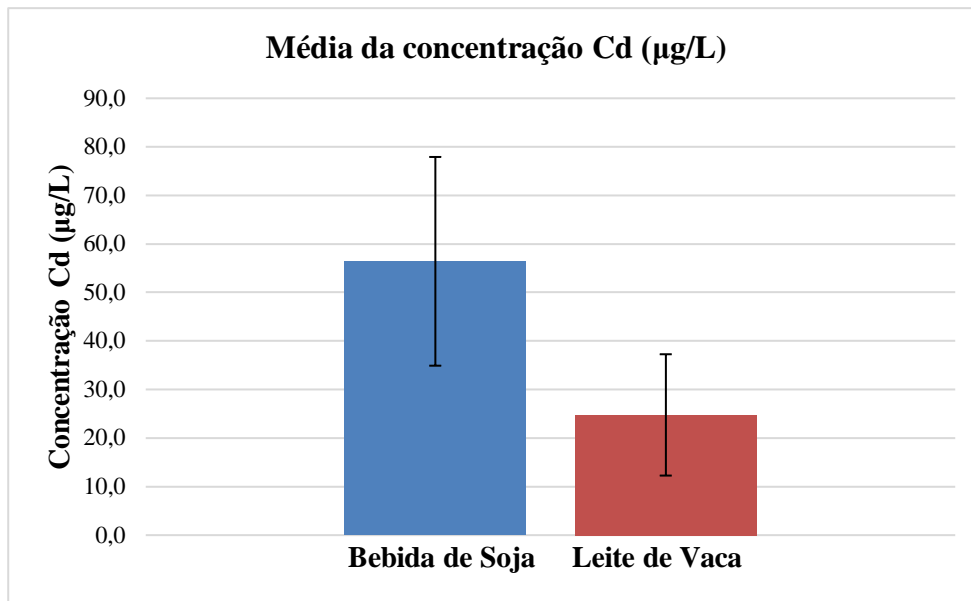


Figura 4.5 - A média da concentração Cd ($\mu\text{g} / \text{L}$) nas amostras de bebidas de soja ($n = 14$) é de $56 \mu\text{g} / \text{L}$ e nas amostras de leite de vaca ($n = 14$) é de $25 \mu\text{g} / \text{L}$. O desvio padrão nas amostras de bebidas de soja é de $43 \mu\text{g} / \text{L}$ e $25 \mu\text{g} / \text{L}$ nas amostras de leite de vaca. (* $p < 0.05$). *: significa que houve uma diferença significativa com $p < 0.05$.

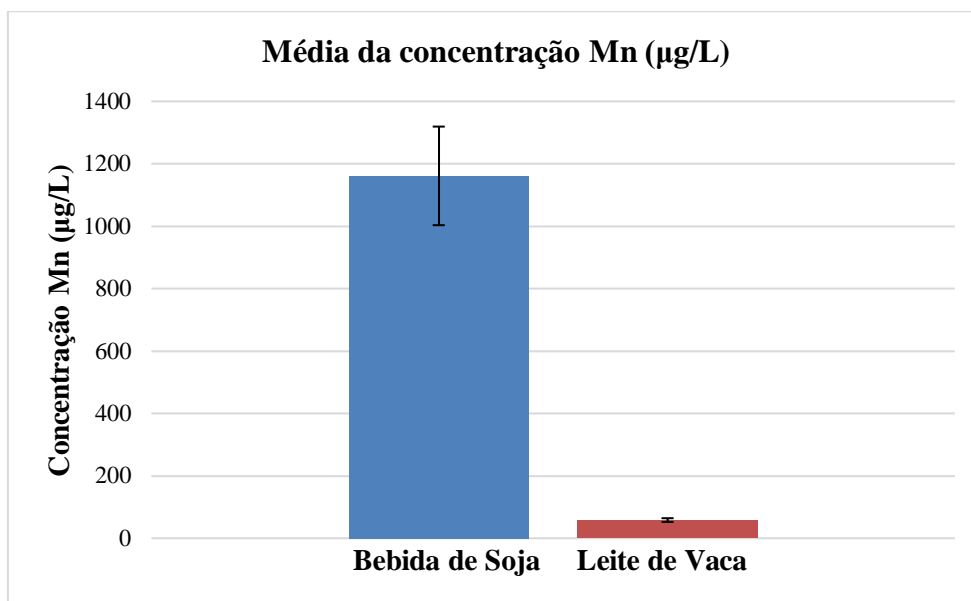


Figura 4.6 - A média da concentração Mn ($\mu\text{g} / \text{L}$) nas amostras de bebidas de soja ($n = 14$) é de $1161 \mu\text{g} / \text{L}$ e nas amostras de leite de vaca ($n = 14$) é de $58 \mu\text{g} / \text{L}$. O desvio padrão nas amostras de bebidas de soja é de $316 \mu\text{g} / \text{L}$ e $12 \mu\text{g} / \text{L}$ nas amostras de leite de vaca. (* $p < 0.05$). *: significa que houve uma diferença significativa com $p < 0.05$.

Ao analisar a figura 4.4, em que estão representadas as médias das concentrações de Pb obtidas nos 14 leites de vaca e nas 14 bebidas de soja analisados, observou-se que não houve uma diferença significativa ($p > 0.05$) entre esses dois grupos de amostras. Os leites de vaca têm uma média de concentração de Pb igual a $193 \mu\text{g} / \text{L}$, superior à nas bebidas de soja de $134 \mu\text{g} / \text{L}$.

De acordo com a figura 4.5, onde se encontram as médias das concentrações de Cd para os 14 leites de vaca e as 14 bebidas de soja analisados, evidencia-se uma diferença significativa ($p < 0.05$) entre esses dois grupos de amostras. As bebidas de soja têm uma média de concentração de Cd igual a $56 \mu\text{g} / \text{L}$, enquanto os leites de vaca têm de $25 \mu\text{g} / \text{L}$.

Na figura 4.6, encontram-se representadas as médias das concentrações de Mn para os 14 leites de vaca e as 14 bebidas de soja analisados, observando-se uma diferença significativa ($p < 0.05$) entre esses dois grupos de amostras. As bebidas de soja têm uma média de concentração de Mn igual a $1161 \mu\text{g} / \text{L}$, cerca de 20 vezes superior à concentração de Mn igual a $58 \mu\text{g} / \text{L}$ nos leites de vaca.

4.3. Comparação dos resultados experimentais com os valores de ingestão diária recomendada para o Pb, Cd e Mn

As diretrizes dietéticas para os americanos 2015-2020 recomendam uma ingestão diária de laticínios. Pelo que para determinar a quantidade de laticínios adequada para as crianças com idades compreendidas entre os 2 e 3 anos e os 4 e 8 anos, usaram os dados do Instituto Nacional do coração, pulmão e sangue. Embora, esses valores correspondam à ingestão diária recomendada de laticínios, neste estudo, assumimos que esses valores correspondem, exclusivamente, ao consumo de leite.

Assim, as Diretrizes Dietéticas dos EUA aconselham a ingestão de 480 mL de leite por dia, correspondente a 2 chávenas para crianças com idades entre os 2 e 3 anos, enquanto para as crianças dos 4 aos 8 anos a dose adequada é de 600 mL por dia, equivalente a 2,5 chávenas. Por outro lado, para os adolescentes dos 9 aos 17 anos e adultos, recomendam o equivalente a 3 chávenas de leite por dia, correspondente a 720 mL de leite (USDHHS and USDA, 2015).

^a Considerando um consumo de 0,480 L de leite por dia

^b Considerando um consumo de 0,600 L de leite por dia

^c Considerando um consumo de 0,720 L de leite por dia

De forma a comparar a concentração de Pb obtida nas amostras de leite de vaca e bebida de soja analisadas com o PTWI do Pb foi estimado um consumo diário de Pb pelos dois tipos de amostra. Os resultados encontram-se na tabela 4.11. Os valores de Pb ingeridos por dia pelo consumo de leite de vaca e bebida de soja foram calculados através da multiplicação da concentração de Pb obtida para cada amostra analisada com a ingestão diária recomendada de leite para adultos ^c.

Tabela 4.11 – Ingestão diária de Pb pelo consumo de leite de vaca ou bebida de soja. Os valores para a ingestão de leite recomendada para adultos foram adquiridos nas diretrizes dietéticas para americanos 2015-2020 (USDHHS and USDA, 2015). Os valores a negrito estão acima do limite da ingestão diária tolerável de Pb para um adulto de 65 Kg.

Amostra	Tipo de leite	[Pb] leite (µg /L)	Ingestão de Pb por dia (µg) para adultos ^c
A	Vaca	303	218,16
B	Vaca	398	287,56
C	Vaca	399	287,28
D	Vaca	56	40,32
E	Vaca	97	69,84
F	Vaca	122	87,84
G	Vaca	251	180,72
H	Vaca	95	68,40
I	Vaca	67	48,24
J	Vaca	159	114,48
K	Vaca	156	112,32
L	Vaca	297	213,84
M	Vaca	237	170,64
N	Vaca	67	48,24
O	Soja	417	300,24
P	Soja	214	154,08
Q	Soja	173	124,56
R	Soja	171	123,12
S	Soja	80	57,60
T	Soja	69	49,68
U	Soja	54	38,88
V	Soja	62	44,64
W	Soja	182	131,04
X	Soja	99	71,28
Y	Soja	119	85,68
Z	Soja	103	74,16
α	Soja	78	56,16
β	Soja	61	43,92

Para um PTWI do chumbo de 25 µg / kg peso corporal por semana (EFSA, 2010b) e considerando um adulto de 65 kg, obtém-se uma previsão de ingestão diária tolerável de Pb igual a 232,14 µg (25 µg / kg x 65 kg / 7 dias = 232,14 µg).

De acordo com a previsão de ingestão diária tolerável de Pb para adultos com 65 Kg (232,14 µg) e analisando a tabela 4.11, as quantidades de Pb ingeridas por dia através do consumo de leites de vaca e bebidas de soja de diferentes marcas são, na sua maior parte, inferiores à ingestão diária de Pb recomendada para adultos. No entanto, as amostras B e C de leite de vaca com valores de 287,56 e 287,28 µg, respectivamente, e a amostra O de bebida de soja com um valor igual a 300,24 µg tenham valores superiores à da ingestão diária recomendada.

Para comparar a concentração de Cd obtida nas amostras de leite de vaca e bebidas de soja analisadas com o PTWI do Cd foi estimado um consumo diário de Cd pelos dois tipos de amostra. Os resultados apresentam-se na tabela 4.12.

Relativamente à estimativa dos valores de Cd ingeridos por dia pelos dois tipos de amostra, fez-se uma multiplicação da concentração de Cd obtida para cada amostra analisada com a ingestão diária recomendada de leite para adultos ^c.

Tabela 4.12 – Ingestão diária de Cd pelo consumo de leite de vaca ou bebida de soja. Os valores recomendados da ingestão de leite para adultos foram adquiridos nas diretrizes dietéticas para americanos 2015-2020 (USDHHS and USDA, 2015). Os valores a negrito estão acima do limite da ingestão diária tolerável de Cd para um adulto de 65 Kg.

Amostra	Tipo de leite	[Cd] leite (µg /L)	Ingestão de Cd por dia (µg) para adultos ^c
A	Vaca	42	30,24
B	Vaca	68	48,96
C	Vaca	89	64,08
D	Vaca	7	5,04
E	Vaca	20	14,40
F	Vaca	14	10,08
G	Vaca	23	16,56
H	Vaca	9	6,48
I	Vaca	20	14,40
J	Vaca	12	8,64
K	Vaca	13	9,36
L	Vaca	17	12,24
M	Vaca	7	5,04
N	Vaca	6	4,32
O	Soja	156	112,32
P	Soja	59	42,48
Q	Soja	113	81,36
R	Soja	115	82,80
S	Soja	64	46,08
T	Soja	30	21,60
U	Soja	9	6,48
V	Soja	39	28,08
W	Soja	31	22,32
X	Soja	44	31,68
Y	Soja	32	23,04
Z	Soja	33	23,76
α	Soja	48	34,56
β	Soja	17	12,24

Para um PTWI do cádmio de 2,5 µg / kg peso corporal por semana (EFSA, 2011) e considerando um adulto de 65 kg, obtém-se uma previsão de ingestão diária tolerável de Cd igual a 21,43 µg (2,5 µg / kg x 65 kg / 7 dias = 21,43 µg).

De acordo com a previsão de ingestão diária tolerável de Cd para um adulto com 65 kg (21,43 µg) e analisando a tabela 4.12, observa-se que a maior parte das quantidades de Cd ingeridas por dia através do consumo de leite de vaca, das amostras analisadas, são inferiores à ingestão diária recomendada de Cd para adultos. No entanto, as amostras A, B e C de leite de vaca contém valores superiores de Cd (30,24; 48,96 e 64,08 µg, respetivamente) à ingestão diária recomendada.

As quantidades de Cd para a bebida de soja são em média superiores às encontradas no leite de vaca.

As amostras O, P, Q, R, S, T, V, W, X, Y, Z e α de bebida de soja, com 112,32; 42,48; 81,36; 82,80; 46,08; 21,60; 28,08; 22,32; 31,68; 23,04; 23,76 e 34,56 µg, respetivamente, têm valores superiores à ingestão diária recomendada de Cd para adultos com 65 Kg, tendo apenas as amostras U, com 6,48 µg e β, com 12,24 µg valores inferiores a este.

De forma a comparar a concentração de Mn obtida nas amostras de leite analisadas com a ingestão de Mn recomendada por dia, pela Autoridade Europeia para a segurança dos Alimentos (EFSA) foi estimado um consumo diário de Mn pelo leite. Os resultados encontram-se na tabela 4.13. Os valores de Mn ingeridos por dia pelos dois tipos de amostra foram calculados através da multiplicação da concentração de Mn obtida para cada amostra analisada com a ingestão diária recomendada de leite para crianças entre os 2 e 3 anos ^a, crianças dos 4 aos 8 anos ^b e adolescentes dos 9 aos 17 anos e adultos ^c, dividindo por 1000.

Tabela 4.13 - Ingestão diária de Mn pelo consumo de leite de vaca ou bebida de soja. Os valores recomendados da ingestão de leite foram adquiridos nas diretrizes dietéticas para americanos 2015-2020 (USDHHS and USDA, 2015), usando dados do instituto nacional do coração, pulmão e sangue (USDHHS PHS and ATSDR, 2012) para determinar a quantidade de leite adequada para crianças com idades entre os 2 a 3 e 4 a 8 anos. Os valores a negrito estão acima dos valores recomendados pela EFSA.

Amostra	Tipo de leite	[Mn] leite (µg/L)	Ingestão de Mn por dia (µg) para crianças com idades entre os 2 e 3 anos ^a	Ingestão de Mn por dia (mg) para crianças com idades entre os 2 e 3 anos ^a	Ingestão de Mn por dia (µg) para crianças com idades entre os 4 e 8 anos ^b	Ingestão de Mn por dia (mg) para crianças com idades entre os 4 e 8 anos ^b	Ingestão de Mn por dia (µg) para idades ≥ 9 anos ^c	Ingestão de Mn por dia (mg) para idades ≥ 9 anos ^c
A	Vaca	71	34,08	0,034	42,60	0,043	51,12	0,051
B	Vaca	89	42,72	0,043	53,40	0,053	64,08	0,064
C	Vaca	72	34,56	0,035	43,20	0,043	51,84	0,052
D	Vaca	56	26,88	0,027	33,60	0,034	40,32	0,040
E	Vaca	67	32,16	0,032	40,20	0,040	48,24	0,048
F	Vaca	66	31,68	0,032	39,60	0,040	47,52	0,048
G	Vaca	54	25,92	0,026	32,40	0,032	38,88	0,039
H	Vaca	50	24,00	0,024	30,00	0,030	36,00	0,036
I	Vaca	54	25,92	0,026	32,40	0,032	38,88	0,039
J	Vaca	52	24,96	0,025	31,20	0,031	37,44	0,037
K	Vaca	47	22,56	0,023	28,20	0,028	33,84	0,034
L	Vaca	51	24,48	0,024	30,60	0,031	36,72	0,037
M	Vaca	46	22,08	0,022	27,60	0,028	33,12	0,033
N	Vaca	55	26,40	0,026	33,00	0,033	39,60	0,040
O	Soja	1266	607,68	0,61	759,60	0,76	911,52	0,91
P	Soja	1219	585,12	0,59	731,40	0,73	877,68	0,88
Q	Soja	1065	511,20	0,51	639,00	0,64	766,80	0,77
R	Soja	1354	649,92	0,65	812,40	0,81	974,88	0,97
S	Soja	1779	853,92	0,85	1067,40	1,07	1280,88	1,28
T	Soja	1042	500,16	0,50	625,20	0,63	750,24	0,75
U	Soja	1773	851,04	0,85	1063,80	1,06	1276,56	1,28
V	Soja	861	413,28	0,41	516,60	0,52	619,92	0,62
W	Soja	1104	529,92	0,53	662,40	0,66	794,88	0,79
X	Soja	963	462,24	0,46	577,80	0,58	693,36	0,69
Y	Soja	723	347,04	0,35	433,80	0,43	520,56	0,52
Z	Soja	1223	587,04	0,59	733,80	0,73	880,56	0,88
A	Soja	1086	521,28	0,52	651,60	0,65	781,92	0,78
B	Soja	797	382,56	0,38	478,20	0,48	573,84	0,57

A Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) recomenda uma ingestão de Mn diária apropriada para crianças com idades entre os 2 e 17 anos e adultos (EFSA, 2013). Os valores estão representados na tabela 4.14.

Tabela 4.14 – A ingestão adequada de Mn, tendo em conta a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) (adaptado de EFSA, 2013).

Idade, para ambos os sexos	Ingestão de Mn por dia (mg)
2-3 anos	0,5
4-6 anos	1
7-10 anos	1,5
11-14 anos	2
15-17 anos	3
≥18 anos	3

De acordo com a ingestão recomendada de Mn pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) (tabela 4.14) e analisando a tabela 4.13, as quantidades de Mn ingeridas por dia através do consumo de leite de vaca são inferiores à dose recomendada para crianças e adolescentes dos 2 aos 17 anos e adultos.

Porém, para a bebida de soja, as quantidades de Mn são muito superiores às encontradas no leite de vaca. Para as crianças dos 2 aos 3 anos, observa-se que a maior parte das amostras de bebida de soja tem um valor superior aos 0,5 mg propostos para a ingestão de Mn por dia. Como é o caso das amostras O, P, Q, R, S, T, U, W, Z e α , sendo as amostras S e U que contém o valor maior (0,85 mg) para a ingestão de Mn pelo consumo de bebidas de soja. Em contrapartida, as amostras V, X, Y e β têm valores inferiores à dose recomendada para esse metal, pelo que as quantidades de Mn se encontram dentro dos limites diários de ingestão, propostos pela EFSA, para esse metal. Para as crianças dos 4 aos 8 anos, apenas as amostras S e U têm valores superiores para a ingestão de Mn pelo consumo de bebidas de soja (1,07 e 1,06 mg, respetivamente) quando comparados com os limites de ingestão propostos pela EFSA, de 1 mg / dia para as crianças dos 4 aos 6 anos e 1,5 mg / dia para as crianças dos 7 aos 10 anos.

No entanto, para as crianças e adultos com idades ≥ 9 , os valores de ingestão de Mn através das amostras de bebida de soja são muito abaixo do valor proposto pela EFSA, de 3 mg/ dia. Porém, é de referir que o Mn não está apenas presente no leite, pelo que se pode ingerir facilmente uma maior quantidade diária de Mn, pelo consumo de outros alimentos.

4.4. Comparação dos resultados obtidos neste estudo com os resultados publicados noutros estudos com o mesmo tipo de amostras

A concentração dos metais Pb, Cd e Mn para as amostras de leite de vaca e bebida de soja, neste estudo, foi comparada com os valores de outros estudos semelhantes, disponíveis na literatura. Os resultados dos estudos apresentam-se nas tabelas seguintes (tabela 4.15 e 4.16).

Tabela 4.15 - Comparação da concentração dos metais ($\mu\text{g} / \text{L}$) Pb, Cd e Mn nas amostras de leite de vaca neste estudo com valores publicados noutros estudos: N.A. - Não Analisado no estudo referido.

Análises do leite de vaca	Concentração dos metais ($\mu\text{g/L}$)		
	Pb	Cd	Mn
Neste estudo	193	25	58
Tripathi, et al., 1999	1,70	0,07	N.A.
Rodríguez et al., 1999	10,25	4,30	N.A.
Pechová et al., 2008	N.A.	N.A.	20,1
Freschi et al., 2011	N.A.	N.A.	2,25 - 4,08
Derakhshesh and Rahimi, 2012	13,45	N.A.	N.A.
Oliveira, T. et al., 2017	2,12 - 37,36	N.A.	N.A.

Tabela 4.16 – Comparação da concentração dos metais ($\mu\text{g} / \text{L}$) Pb, Cd e Mn nas amostras de bebida de soja neste estudo com valores publicados noutros estudos: N.A. - Não Analisado no estudo referido.

Análises da bebida de soja	Concentração de metais ($\mu\text{g/L}$)		
	Pb	Cd	Mn
Neste estudo	134	56	1161
Cockell et al., 2004	N.A.	N.A.	1820
Zhao et al., 2014	340 - 2830	110 - 910	N.A.
Sadrabad et al., 2018	15 - 118	8 - 160	N.A.

A concentração de metais pesados em produtos lácteos depende de muitos fatores, entre os quais estão a localização geográfica e a intensidade da atividade industrial nesses locais (J. Food and Dairy Sci., 2018).

A presença de chumbo e cádmio nas amostras de leite pode ser devido às condições dos solos, uso de pesticidas, água, condições atmosféricas e etapas de processamento e armazenamento na produção do leite. A água é uma das mais importantes fontes de contaminação por chumbo no leite de vaca. (Derakhshesh and Rahimi, 2012; Ziarati et al., 2018).

Ao comparar os valores obtidos para os metais de interesse nos outros estudos da literatura com o nosso estudo observa-se uma ampla faixa de variação entre os valores obtidos, principalmente para os leites de vaca. Para a discrepância destes valores contribui o facto dos leites de vaca e bebidas de soja de outros estudos serem provenientes de vários países (como, o Brasil ou o Irão) com condições provavelmente muito diferentes. As concentrações dos metais poderão, então, refletir as diferentes composições do solo (fatores ambientais), fatores genéticos e estados de nutrição e lactação do animal (neste caso, a vaca), donde provém esses leites (Tripathi et al., 1999;

Rodríguez et al., 1999; Pechová et al., 2008; Freschi et al., 2011; Derakhshesh and Rahimi, 2012; Oliveira et al., 2017; Zhao et al., 2014; Sadrabad et al., 2018).

Em contrapartida, se os elementos são menos móveis no sistema solo-planta, como é o caso do chumbo, as fontes de contaminação do leite de vaca e da bebida de soja podem ser devido às diferentes características das práticas de fabrico e possíveis contaminações do equipamento durante o processo de produção do leite. Por exemplo, a qualidade da embalagem pode influenciar o teor de metais no leite por migração para o alimento (Ziarati et al., 2018).

Num dos estudos relatados verificou-se que, para os leites de vaca analisados, a concentração de Mn aumentou com o avanço da lactação (Pechová et al., 2008).

Nos estudos da literatura obtiveram-se valores baixos para o Pb e Cd nos leites de vaca analisados, o que levou a concluir que estes não apresentavam risco à saúde humana (lactentes e adultos) (Tripathi et al., 1999; Rodríguez et al., 1999). Num dos estudos, concluiu-se, ainda, que a faixa de concentração geral do chumbo nas amostras de leite de vaca analisadas se encontrava dentro dos valores relatados na literatura de outros países (Derakhshesh and Rahimi, 2012).

Relativamente às bebidas de soja verificou-se que num dos estudos referidos a concentração de Mn era elevada (Cockell, 2004).

Num dos estudos observou-se que a soja não era poluída por metais pesados, como o Pb e Cd. Esse facto mostrou que os solos, em que a soja foi cultivada, tinham um baixo teor de metais pesados, porque se houvesse contaminação por metais, estes seriam transferidos para as plantas (Sadrabad et al., 2018). Em contrapartida, num outro estudo as concentrações de Pb e Cd foram elevadas na soja, fornecendo evidências de que estes metais são uma preocupação em solos agrícolas e na soja (Zhao et al., 2014).

O leite é um alimento importante na dieta humana pela sua composição, sendo consumido a uma taxa elevada pelas crianças e idosos. No entanto, é um alimento que contém metais tóxicos, tornando-se necessário monitorizar a contaminação do leite, devido a serem metais que bioacumulam e causam danos na saúde humana, mesmo quando em baixas concentrações (Oliveira et al., 2017).

Nos países desenvolvidos ou em desenvolvimento encontram-se níveis elevados de metais pesados no leite, quer devido à rápida urbanização e industrialização, regulamentos menos rígidos e implementações inadequadas ou ineficiência das agências de aplicação da lei.

Os níveis elevados de metais pesados em amostras de leite, particularmente de chumbo e cádmio, exigem um controlo rigoroso pelos órgãos de proteção da saúde e meio ambiente.

Por isso, é necessária uma avaliação mais rigorosa dos metais pesados no leite por parte dos órgãos de saúde e proteção ambiental, de forma a aumentar a atenção sobre este problema de saúde pública (Ismail et al., 2017).

Para monitorizar o nível de metais pesados, a água usada para dar de beber aos animais e a forragem devem ser inspeccionadas regularmente. Os animais e terras usadas para forragem animal devem estar longe de áreas industriais e de um elevado tráfego, de forma a prevenir a contaminação por metais tóxicos (Ziarati et al., 2018).

As bombas manuais e os poços tubulares, que são usados para usos domésticos em áreas contaminadas com chumbo, devem ser identificados para poderem ser removidos e controlados ao nível da corrosão, uma vez que a maior parte do chumbo na água potável provém do encanamento de edifícios (WHO, 2011). Em alternativa a esta disponibilização de água potável adequada para consumo humano, poderão usar-se água de superfície microbiologicamente segura (por exemplo, água da chuva coletada) ou outras fontes de água subterrânea (WHO, 2010).

Ao nível da contaminação de metais durante o manuseio, processamento e armazenamento de leite e produtos lácteos, devem ser tomadas medidas de prevenção, como, por exemplo, apenas serem usados materiais para uso alimentar (Ziarati et al., 2018).

No nosso estudo, algumas amostras de leite de vaca e de bebidas de soja ultrapassaram os valores da previsão de ingestão diária tolerável para o chumbo e o cádmio. No entanto, é importante referir que os valores obtidos para a ingestão diária de Pb, Cd e Mn, através das amostras analisadas foram calculados assumindo as exigências de consumo diário de leite proposto pelas diretrizes alimentares para os americanos. Porém, o valor recomendado inclui outros produtos lácteos (como o iogurte e o queijo) e, por isso, os resultados obtidos são aproximações, uma vez que os outros produtos lácteos podem ter concentrações menores ou maiores desses metais. Além disso, no cálculo da ingestão diária tolerável de Pb e Cd considerou-se um adulto de 65 Kg, excluindo adultos com outro peso (a ingestão diária tolerável depende do peso corporal da criança/adulto).

Assim, consumir leite de vaca e bebidas de soja que excedam os valores máximos de metais não implica necessariamente um risco aumentado para a saúde humana.

No nosso estudo e nos outros estudos da literatura, os valores de Mn no leite de vaca são baixos, quando comparados com a ingestão diária recomendada de Mn para crianças e adultos.

No entanto é de referir que o Mn não se encontra apenas presente no leite, podendo ingerir-se facilmente uma maior quantidade diária de Mn, através do consumo de outros alimentos.

Em contrapartida, para as bebidas de soja, os valores de Mn são altos quando comparados com a ingestão diária de Mn para crianças.

5. Conclusões

Neste estudo, foi realizada uma análise de concentrações de metais em amostras de leite de vaca e amostras de bebida de soja de marcas diferentes disponíveis no mercado português. Os metais selecionados foram o chumbo, o cádmio e o manganês, cuja determinação é importante do ponto de vista toxicológico.

A quantificação dos metais foi realizada por Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite. Os resultados obtidos indicaram confiança satisfatória através do estudo de parâmetros, como a linearidade, gama de trabalho, limites analíticos, precisão (repetibilidade, precisão intermediária) e exatidão. No entanto, os valores obtidos para a recuperação pós digestão poderão indicar possíveis interferências, durante o método de digestão por microondas.

Os resultados da quantificação de metais mostraram uma média de concentração de chumbo nas amostras de leite de vaca maior à das amostras de bebida de soja, uma concentração média de cádmio para as amostras de bebida de soja superior à das amostras de leite de vaca e uma concentração média de manganês nas amostras de bebida de soja cerca de 20 vezes superior à nas amostras de leite de vaca.

Comparando a estimativa da quantidade de Pb consumida por dia pelos adultos através da ingestão dos leites de vaca e bebidas de soja analisados, com a previsão da ingestão diária tolerável de Pb para adultos de 65 Kg, a concentração de Pb é superior ao valor máximo (232,14 µg) em duas amostras de leite de vaca (B e C) e numa amostra de bebida de soja (O).

Comparando a estimativa da quantidade de Cd consumida por dia pelos adultos através da ingestão dos leites de vaca e bebidas de soja analisados com a previsão da ingestão diária tolerável de Cd para adultos de 65 Kg, a concentração de Cd é superior ao valor máximo (21,43 µg) em três amostras de leite de vaca (A, B e C) e em doze amostras de bebida de soja (O, P, Q, R, S, T, V, W, X, Y, Z e α).

Comparando a estimativa da quantidade de Mn consumida por dia pelas crianças e adultos que consomem as bebidas de soja e os leites de vaca analisados com a ingestão diária recomendada de Mn pela EFSA, os resultados para as amostras de leites de vaca mostram valores inferiores à dose recomendada por dia para adultos e crianças/adolescentes dos 2 aos 17 anos. No entanto, nas bebidas de soja, as concentrações de Mn são muito superiores, principalmente para as crianças dos 2 aos 8 anos, sendo preocupante ao nível da sua formação, uma vez que o órgão mais sensível a elevadas concentrações de manganês é o cérebro.

Com este estudo, podemos concluir que os adultos que consomem leite de vaca estão a ingerir uma maior concentração de Pb. E que os adultos que consomem bebida de soja estão a ingerir maiores concentrações de Cd e Mn do que aqueles que optam pelo leite de vaca. No entanto, os resultados obtidos do Mn para os adultos nas amostras de bebida de soja são inferiores à ingestão diária recomendada para este metal. Em contrapartida, os resultados obtidos para crianças mostram que estas ao consumirem bebida de soja são mais vulneráveis aos efeitos tóxicos do Mn do que os adultos, porque ao ingerirem o leite diário recomendado, estão a consumir uma concentração de Mn muito superior à recomendada. As crianças como têm um peso corporal menor do que os adultos, ao consumirem a mesma concentração de Mn que estes, estarão expostas

a uma concentração superior de Mn por unidade de peso corporal. Dessa forma, a ingestão diária recomendada de Mn para as crianças é menor do que a dos adultos.

Na comparação dos valores de metais obtidos nos leites de vaca e bebidas de soja analisados com os valores publicados em estudos semelhantes da literatura, é possível afirmar que os valores são discrepantes entre si. Como existem vários fatores que influenciam a presença de metais no leite, como as composições do solo e a intensidade da atividade industrial no local da sua origem, a variação dos valores relatados na literatura estudados pode ser explicada pelos leites serem provenientes de diferentes países e, provavelmente, com condições muito diferentes.

A fim de evitar a contaminação ambiental com metais pesados, que é reconhecido como um perigo de saúde pública para todo o mundo, sugere-se uma monitorização dos metais pesados, por exemplo, nas bombas manuais e poços tubulares, que são usados para usos doméstico, visando a diminuição das quantidades de metais na água potável, já que esta é uma das principais possíveis fontes de contaminação no leite.

É, ainda, importante de referir, que neste estudo, os valores obtidos para a ingestão diária de Pb, Cd e Mn, através de amostras de leite de vaca e bebidas de soja, foram calculados assumindo as exigências de consumo diário de leite proposto pelas diretrizes alimentares para os americanos. No entanto, o valor recomendado inclui outros produtos lácteos (como o iogurte e o queijo) e, por isso, os resultados obtidos são apenas aproximações, uma vez que os outros produtos lácteos podem ter concentrações menores ou maiores desses metais. Além disso, considerou-se a ingestão diária recomendada de Mn por dia, pela EFSA, correspondente à concentração de Mn proveniente por todas as fontes deste metal e não apenas pelo leite. Para além de ter sido calculada uma ingestão diária tolerável de Pb e Cd para um adulto de 65 Kg, excluindo adultos com outro peso (a ingestão diária tolerável depende do peso corporal da criança/adulto). Assim, consumir uma quantidade de leite que exceda estes valores não implica necessariamente um risco aumentado para a saúde. Porém, este tipo de estudo é essencial para garantir a segurança dos alimentos, por permitir fazer uma estimativa da ingestão de metais através da alimentação.

6. Referências Bibliográficas

Abu-Samra, A., Morris, J., Koirtiyohann, S. (1975). Wet ashing of some biological samples in a microwave oven. *Analytical Chemistry*, 47 (8): 1475 – 1477.

Anastácio, M., dos Santos, A. P. M., Aschner, M., & Mateus, L. (2018). Determination of trace metals in fruit juices in the Portuguese market. *Toxicology Reports*, 5: 434 – 439.

Anon. (2019). [Internet]. Pesquisa em:
<https://www.tetrapak.com/about/soya-handbook> [Acedido a 7/7/2020].

Amorim, F. A. C., Lobo, I. P., Santos, V. L. C. S., Ferreira, S. L. C. (2008). Espectrometria de absorção atômica: o caminho para determinações multi-elementares. *Química Nova*, 31 (7): 1784 – 1790.

[ASAE] Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. (2019). Perigos de Origem Alimentar. [Internet]. Pesquisa em:
<https://www.asae.gov.pt/cientifico-laboratorial/area-tecnico-cientifica/perigos-de-origem-alimentar.aspx> [acedido a 6/5/2019].

Aschner, M., Erikson, K. M., Dorman, D. C. (2005). Manganese Dosimetry: Species Differences and Implications for Neurotoxicity. *Critical Reviews in Toxicology*, 35: 1 – 32.

Aschner, M. and Erikson, K. (2017). Manganese. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 8(3): 520 – 521.

[ATSDR] Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (2005). Toxicological Profile for Lead (Update). Atlanta, GA: Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1 – 577.

[ATSDR] Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (2008). Toxicological Profile for Cadmium (Update). Atlanta, GA: Agency for Toxic Substance and Disease Registry, 1 – 512.

Aschner, M., Guilarte, T.R., Schneider, J.S., et al. (2007). Manganese: recent advances in understanding its transport and neurotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 221: 131–147.

Bader, N.R. (2011). Sample preparation for trace element analysis by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectroscopy (GFAAS): An overview. *Der Chem. Sinica*, 2 (5): 211 – 219.

Baird, C. (2002). *Química ambiental*. Porto Alegre: Bookman, 402 – 433.

Beaty, Richard D. and Kerber, Jack D. (1993). *Concepts, Instrumentation and Techniques in Atomic Absorption Spectrophotometry*. The Perkin-Elmer Corporation. 2nd Edition.

Berghof. (2014). Theory of sample preparation using acid digestion, pressure digestion and microwave digestion (microwave decomposition). [Internet]. Pesquisa em:

https://www.academia.edu/29186090/Theory_of_Sample_Preparation_Using_Acid_Digestion_Pressure_Digestion_and_Microwave_Digestion_Microwave_Decomposition [Acedido a 9/7/2020].

Bizzi, C., Marlon de Moraes Flores, É., Sogari Picoloto, R., Smanioto Barin, J., Araújo Nóbrega, J. (2010). Microwave-assisted digestion in closed vessels: effect of pressurization with oxygen on digestion process with diluted nitric acid. *Analytical Methods*, 2 (6): 734.

Bizzi, C., Flores, E., Barin, J., Garcia, E., Nóbrega, J. (2011). Understanding the process of microwave-assisted digestion combining diluted nitric acid and oxygen as auxiliary reagent. *Microchemical Journal*, 99 (2): 193 – 196.

Bojinova, P., Georgiev, B., Krasteva, V., Chuldjian, H., Stanislavova, L. (1994). Investigation about the heavy metal pollution in soils and agricultural crops in the region of nonferrous metal works 'D. Blagoev'. *Soil science, agrochemistry and ecology*, 4 (6): 32 – 40.

Cashman, K.D. (2011). Trace elements, nutritional significance. In *Encyclopedia of dairy science* (ed. by J.W. Fuquay, P.F. Fox, P.L.H. McSweeney), vol. 3, 2nd Edition. Academic press, 933 – 940.

Cindrić, I. J., Zeiner, M., Kröpl, M., Stinger, G. (2011). Comparison of sample preparation methods for the ICP-AES determination of minor and major elements in clarified apple juices. *Microchemical Journal*, 99: 364 – 369.

Cockell, K.A., Bonacci, G., & Belonje, B. (2004). O teor de manganês de bebidas de soja ou arroz é alto em comparação com as fórmulas infantis. *Journal of the American College of Nutrition*, 23 (2): 124 – 130.

Crossgrove, J. and Zheng, W. (2004). Manganese toxicity upon overexposure. *NMR Biomed*, 17: 544 – 553.

Derakhshesh, S.M. and Rahimi, E. (2012). Determination of Lead Residue in Raw Cow Milk from Different Regions of Iran by Flameless Atomic Absorption Spectrometry. *American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences*, 4 (1): 16 – 19.

Dorne, J.L., Fink-Gremmels, J. (2013). Human and animal health risk assessments of chemicals in the food chain: comparative aspects and future perspectives. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 270: 187 – 195.

[DRAP Centro] Direção Regional De Agricultura E Pescas Do Centro. (2018) Segurança Alimentar Síntese da legislação. Portal EUROPA [Internet]. Pesquisa em: http://www.drapc.min-agricultura.pt/base/geral/files/seguranca_alimentar.pdf [acedido a 6/5/2019].

Dutra de Oliveira, J. E., Santos, A. C., Wilson, E. D. (1982). *Nutrição básica*. São Paulo: Sarvier, 286.

[EFSA] Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA). (2002). Portal Europa. [Internet]. Pesquisa em: https://europa.eu/european-union/about-eu/agencies/efsa_pt#como-funciona-a-efsa? [acedido a 6/5/2019].

[EFSA] European Food Safety Authority. (2010a). EFSA assesses health implications of lead in food. [Internet]. Pesquisa em: <http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/contam100420> [Acedido a 6/5/2019].

[EFSA] European Food Safety Authority. (2010b). Scientific Opinion on Lead in Food. EFSA Journal, 8 (4): 1570.

[EFSA] European Food Safety Authority. (2011). Statement on tolerable weekly intake for cadmium. EFSA Journal, 9 (2): 1975.

[EFSA] European Food Safety Authority. (2012). Scientific topic: Metals as contaminants in food | European Food. [Internet]. Pesquisa em: <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/metals-contaminants-food> [acedido 6/5/2019].

[EFSA] European Food Safety Authority. (2013). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for manganese. EFSA Journal, 11 (11): 3419.

[EU] European Union - Europa EU. (2019). Food safety in the EU [Internet]. Pesquisa em: https://europa.eu/european-union/topics/food-safety_pt [acedido a 6/5/2019].

Fernandes, A.S., Caneiras, C., Oliveira, N.G., Costa, J., Cabral, M.F., Castro M. (2006). Cádmio: Fontes de exposição e efeitos tóxicos para o homem. [Internet]. Pesquisa em: <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-quimicos/cadmio.aspx> [Acedido a 22/5/2020].

Fernández, B., Lobo, L., Pereiro, R. (2018). Atomic Absorption Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation and Capabilities. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering.

Franco, B.D.G.M. and Cozzolino, S.M.F. (2010). Segurança e Alimento. São Paulo: Blucher, v.2, 110.

Freschi, G. P. G., Fortunato, F. M., Freschi, C. D., & Neto, J. A. G. (2011). Simultaneous and Direct Determination of As, Bi, Pb, Sb, and Se and Co, Cr, Cu, Fe, and Mn in Milk by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. Food Analytical Methods, 5 (4): 861 – 866.

Froes, R.E.S., Windmüller, C.C e Silva, J.B.B da. (2006). Emprego da Modificação Química Permanente para a determinação de metais em matrizes diversas por Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite. Revista Analytica, nº 23.

[FSAI] Food Safety Authority of Ireland. (2009). Mercury, Lead, Cadmium, Tin and Arsenic in Food. [Internet]. Pesquisa em: <https://www.fsai.ie/workarea/downloadasset.aspx?id=8412> [Acedido a 5/7/2019].

- Food, J. and Dairy, Sci. (2018). Risk Assessment of Certain Heavy Metals and Trace Elements in Milk and Milk Products Consumed in Aswan Province. Khalil, O. S. F. Mansoura Univ., 9 (8): 289 – 296.
- Genovese, M.I., Pinto, M.S., Barbosa, A.C.L. Lajolo, F.M. Avaliação do teor de isoflavonas de “suplementos nutricionais à base de soja”. Revista Brasileira de Ciências farmacêuticas, v.39, nº2, 159 – 167.
- Gonzalez, M., Souza, G., Oliveira, R., Forato, L., Nóbrega, J., Nogueira, A. (2009). Microwave-assisted digestion procedures for biological samples with diluted nitric acid: Identification of reaction products. Talanta, 79 (2): 396 – 401.
- Goyer, R.A. (1990). Lead toxicity: from overt to subclinical to subtle health effects. Environ Health Perspect, 86: 177 – 181.
- Guilarte, T.R. (2010). Manganese and Parkinson’s disease: a critical review and new findings. Environ Health Perspect, 118: 1071 – 1080.
- Gulson, B.L., Mizon, K.J., Korsch, M.J., et al. (2003). Mobilization of lead from human bone tissue during pregnancy and lactation—a summary of long-term research. Sci Total Environ, 303:79 – 104.
- Holcombe, J. A. and Borges, D. L. G. (2010). Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. Encyclopedia of Analytical Chemistry, 1– 20.
- Ismail, A., Riaz, M., Akhtar, S., Goodwill, J. E., & Sun, J. (2017). Heavy metals in milk: global prevalence and health risk assessment. Toxin Reviews, 1 – 12.
- Järup, L., Berglund, M., Elinder, C.G., et al. (1998). Health effects of cadmium exposure—a review of the literature and a risk estimate. Scand J Work Environ Health, 24 (suppl 1): 1 – 51.
- Jiang, Y. and Zheng, W. (2005). Cardiovascular toxicities upon manganese exposure. Cardiovasc Toxicol, 5: 345 – 354.
- Jiang, S., Cai, W., Xu, B. (2013). Food Quality Improvement of Soy Milk Made from Short-Time Germinated Soybeans. Foods, 2 (2): 198 – 212.
- Kazi, T.G., Jalbani, N., Baig, J.A. et al. (2009). Assessment of toxic metals in raw and processed milk samples using electrothermal atomic absorption spectrophotometer. Food Chem. Toxicol, 47: 2163 – 2169.
- Khan, S., Cao, Q., Zheng, Y.M., Huang, Y.Z., Zhu, Y.G. (2008). Health risks of heavy metals in contaminated soils and food crops irrigated with wastewater in Beijing, China. Environ Pollut, 152: 686 – 692.
- Klaassen, C.D., Liu, J., Choudhuri, S. (1999). Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 39: 267 – 294.

Klaassen, Curtis.D. (2013). Casaret & Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons. 8th Edition.

Klimisch, H.J. (1993). Lung deposition, lung clearance and renal accumulation of inhaled cadmium chloride and cadmium sulphide in rats. *Toxicology*, 84: 103 – 124.

Korn, M.G.A., Boa Morte, E.S., Santos, D.C.M.B., Castro, J.T., Barbosa, J.T.P., Teixeira, A.P., Fernandes, A.P., Welz, B., Santos, W.P.C., Santos, E.B.G.N., Korn, M. (2008). Sample Preparation for the Determination of Metals in Food Samples Using Spectroanalytical Methods — A Review. *Appl Spectrosc Rev*, 43: 67 – 92.

Lamble, K. and Hill, S. (1998). Microwave digestion procedures for environmental matrices. *The Analyst*, 123 (7): 103 – 133.

Levin, R., Brown, M.J., Kashtock, M.E., et al. (2008) Lead exposures in U.S. children, 2008: implications for prevention. *Environ Health Perspect*, 116:1285 – 1293.

Licata, P., Trombetta, D., Cristani, M., Giofre, F., Martino, D., Calo, M., Naccari, F. (2004). Levels of “toxic” and “essential” metals in samples of bovine milk from various dairy farms in Calabria, Italy. *Environ. Int.*, 30: 1 – 6.

Mahaffey, K.R. (1985). Factors modifying susceptibility to lead toxicity. In: Mahaffey KR, ed. *Dietary and Environmental Lead: Human Health Effects*. New York: Elsevier, 373 – 420.

Manton, W.I., Angle, C.R., Krogstrand, K.L. (2005). Origin of lead in the United States diet. *Environ Sci Technol*, 15: 8995 – 9000.

Marques, T. L., Wiltsche, H., Nóbrega, J. A., Winkler, M., Knapp, G. (2017). Performance evaluation of a high-pressure microwave-assisted flow digestion system for juice and milk sample preparation. *Anal Bioanal Chem*, 409: 4449 – 4458.

Melo, A. A. S. de, Ferreira, M. de A., Veras, A. S. C., Iira, M. de A., Lima, L. E. de, Vilela, M. da S., Melo, E. O. S. de, Araújo, P. R. B. (2003). *Rev. Bras. Zootec.*, 32 (3): 727 – 736.

Meshref, Arafa M. S., Moselhy, Walaa A., Hassan, Nour El-Houda Y. (2014). Heavy metals and trace elements levels in milk and milk products. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 8 (4): 381 – 388.

Mitra, P., Sharma, S., Purohit, P., Sharma, P. (2017). Clinical and molecular aspects of lead toxicity: An update. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 54 (7-8): 506 – 528.

Mohammadi S, Ziarati P. 2015. Heavy Metal Removal from Commercially - available. *Orient. J. Chem.* 31 (1): 409 – 415.

Nordberg, G.F., Nogawa, K., Nordberg, M., et al. (2007). Cadmium. In: Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, Friberg LT, eds. *Handbook on the Toxicology of Metals*. New York: Elsevier, 445 – 486.

Oliveira, T. et al. (2017). Direct Determination of Pb in Raw Milk by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry (GF AAS) with Electrothermal Atomization Sampling from Slurries. *Food Chemistry*, 229: 721 – 25.

Paganini, W. da S., Souza, A. de, Bocchiglieri, M. M. (2004). Avaliação do comportamento de metais pesados no tratamento de esgotos por disposição no solo. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, 9 (3): 225 – 239.

Patrick, L. (2006). Lead toxicity, a review of the literature. Part 1: exposure, evaluation, and treatment. *Altern Med Rev*, 11: 2 – 22.

Pechová, A., Pavlata, L., Dvořák, R., & Lokajová, E. (2008). Contents of Zn, Cu, Mn and Se in Milk in Relation to their Concentrations in Blood, Milk Yield and Stage of Lactation in Dairy Cattle. *Acta Veterinaria Brno*, 77 (4): 523 – 531.

Pereira, F.P., Santos, O.A. R., Resende, R.C.M., Henriques, B.O. (2017). Avaliação comparativa da composição nutricional do leite de soja em relação ao leite de vaca com e sem lactose. *Revista Acadêmica Conecta FASF*, 2 (1): 378 – 392.

Perkin Elmer. (2013a). Atomic Spectroscopy - A Guide to Selecting the Appropriate Technique and System. [Internet]. Pesquisa em: https://www.perkinelmer.com/labsolutions/resources/docs/BRO_WorldLeaderAAICPMSICPM S.pdf [Acedido a 1/6/2020].

Perkin Elmer. (2013b). HGA Graphite Furnace Atomic Absorption AA – Automatic Matrix Modification for Improved Analytical Quality and Sample Throughput. [Internet]. Pesquisa em: https://www.perkinelmer.com/labsolutions/resources/docs/TCH_HGA_Matrix_Modifier_Table_Technical_Note_006125A_01.pdf [acedido a 6/6/2020].

Pronczuk de Garbino J, ed. (2005). Children's health and the environment: a global perspective. Geneva, World Health Organization. [Internet]. Pesquisa em: http://whqlibdoc.who.int/publications/2005/9241562927_eng.pdf [Acedido a 11 /5/2019].

[RELACRE] Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal. (2000). Guia Relacre 13 – Validação de métodos internos de ensaio em análise química. Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal. Lisboa (Portugal): RELACRE.

Rodríguez Rodríguez, E. M., Delgado Uretra, E., & Díaz Romero, C. (1999). Concentrations of cadmium and lead in different types of milk. *Z Lebensm Unters Forsch A*, 208(3): 162 – 168.

Roth, J.A. and Garrick, M.D. (2003). Iron interactions and other biological reactions mediating the physiological and toxic actions of manganese. *Biochem Pharmacol*, 66: 1 – 13.

Ryu, D.Y., Lee, S-J., Park, D.W., et al. (2004). Dietary iron regulates intestinal cadmium absorption through iron transporters in rats. *Toxicol Lett*, 152: 19 – 25.

Sadrabad, E.K., Boroujeni, H.M., Ali Heydari, A. (2018). Heavy Metal Accumulation in soybeans cultivated in Iran, 2015-2016. *JNFS*, 3 (1): 27 – 32.

Soyconnection.com. (2019). Food Industry Insights| Soy Connection | The United Soybean Board. [Internet]. Pesquisa em: <https://www.soyconnection.com/foodindustry/insights> [Acedido a 7 /7/2020].

Salah, F.A.A.E., et al. (2013). Resíduos de metais pesados e oligoelementos no leite em pó comercializado na província de Dakahlia. *International Food Research Journal*, 20 (4): 1807 – 1812.

Satarug, S. and Moore, M. R. (2004). Adverse Health Effects of Chronic Exposure to Low-Level Cadmium in Foodstuffs and Cigarette Smoke. *Environ Health Perspect*, 112 (10): 1099 –1103.

Shurtleff, W. and Aoyagi, A. (2019). History of Soymilk and Dairy-like Soymilk Products - Page 1. [Internet]. Pesquisa em: <http://www.soyinfocenter.com/HSS/soymilk1.php> [Acedido a 7/7/2020].

Silbergeld, E.K., Sauk, J., Somerman, M., et al. (1993). Lead in bone: storage site, exposure source, and target organ. *Neurotoxicology*, 14: 225 – 236.

Tashima, E.H. and Cardello, H.M.A.B. (2003). Perfil sensorial de extrato hidrossolúvel de soja comercial adotado com sacarose e sucralose. *B. CEPPA, Curitiba*, v. 21, nº2, 409 – 428.

Thorning, T., Raben, A., Tholstrup, T., Soedamah-Muthu, S., Givens, I., Astrup, A. (2016). Milk and dairy products: good or bad for human health? An assessment of the totality of scientific evidence. *Food & Nutrition Research*, 60 (1): 32527.

Tripathi, R., Raghunath, R., Sastry, V., Krishnamoorthy, T. (1999). Daily intake of heavy metals by infants through milk and milk products. *The Science of the Total Environment*, 227 (2 - 3): 229 – 235.

[USDHHS and USDA] United States Department of Health and Human Services and United States Department of Agriculture. 2015 – 2020 Dietary Guidelines for Americans. 8th Edition. December 2015. [Internet]. Pesquisa em: <http://health.gov/dietaryguidelines/2015/guidelines/> [Acedido a 30/7/2020].

[USDHHS PHS and ATSDR] United States Department of Health and Human Services Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (2012). Toxicological Profile For Manganese.

UVA, A.S., FARIA, M. (2000). Exposição profissional a substâncias químicas: diagnóstico das situações de risco. *Revista Portuguesa de Saúde Pública*, 18 (1): 5 – 9.

[WHO/ Europe] World Health Organization/ Europe. (2009). Exposure of Children to Chemical Hazards in Food, ENHIS, fact sheet 4.4.

[WHO] World Health Organization. (2010). Preventing Disease through Healthy Environments. Action is needed on chemicals of major public health concern. World Health Organization. Geneva (Switzerland): WHO.

[WHO] World Health Organization. (2011). Lead in Drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. World Health Organization. Geneva (Switzerland): WHO.

Wong, M., Gu, W., Ng, T. (1997). Sample preparation using microwave assisted digestion or extraction techniques. *Analytical Sciences*, 13 (Supplement): 97 – 102.

Wu, Y., Yang, X., Ge, J., et al. (2011). Blood lead level and its relationship to certain essential elements in the children aged 0 to 14 years from Beijing, China. *Sci Total Environ*, 409: 3016 – 3020.

Zalpus, R.K. and Ahmad, S. (2003). Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. *Toxicol Appl Pharmacol*, 186: 163 – 188.

Zhao, Y., Fang, X., Mu, Y., Cheng, Y., Ma, Q., Nian, H., & Yang, C. (2014). Metal Pollution (Cd, Pb, Zn, and As) in Agricultural Soils and Soybean, *Glycine max*, in Southern China. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 92 (4): 427 – 432.

Zhuang, M.B. McBride, H. Xia, N. Li, Z. Li. (2009). Health risk from heavy metals via consumption of food crops in the vicinity of Dabaoshan mine, south China. *Sci. Total Environ*, 407 : 1551 – 1561.

Ziarati, P., Shir Khan, F., Mostafidi, M., Zahedi, M.T. (2018). An Overview of the Heavy Metal Contamination in Milk and Dairy Products. *Acta Scientific Pharmaceutical Sciences*, Volume 2, Issue 7.

Ziegler, E.E., Edwards, B.B., Jensen, R.L., et al. (1978). Absorption and retention of lead by infants. *Pediatr Res*, 12: 29 – 34.

7. Anexos

Tabela 7.1 - Distribuição de Fisher-Snedecor com um nível de significância $\alpha = 0,01$.

df ₂	Numerator Degrees of Freedom									
	df ₁	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1		4052.2	4999.5	5403.4	5624.6	5763.6	5859.0	5928.4	5981.1	6022.5
2		98.503	99.000	99.166	99.249	99.299	99.333	99.356	99.374	99.388
3		34.116	30.817	29.457	28.710	28.237	27.911	27.672	27.489	27.345
4		21.198	18.000	16.694	15.977	15.522	15.207	14.976	14.799	14.659
5		16.258	13.274	12.060	11.392	10.967	10.672	10.456	10.289	10.158
6		13.745	10.925	9.7795	9.1483	8.7459	8.4661	8.2600	8.1017	7.9761
7		12.246	9.5466	8.4513	7.8466	7.4604	7.1914	6.9928	6.8400	6.7188
8		11.259	8.6491	7.5910	7.0061	6.6318	6.3707	6.1776	6.0289	5.9106
9		10.561	8.0215	6.9919	6.4221	6.0569	5.8018	5.6129	5.4671	5.3511
10		10.044	7.5594	6.5523	5.9943	5.6363	5.3858	5.2001	5.0567	4.9424
11		9.6460	7.2057	6.2167	5.6683	5.3160	5.0692	4.8861	4.7445	4.6315
12		9.3302	6.9266	5.9525	5.4120	5.0643	4.8206	4.6395	4.4994	4.3875
13		9.0738	6.7010	5.7394	5.2053	4.8616	4.6204	4.4410	4.3021	4.1911
14		8.8616	6.5149	5.5639	5.0354	4.6950	4.4558	4.2779	4.1399	4.0297
15		8.6831	6.3589	5.4170	4.8932	4.5556	4.3183	4.1415	4.0045	3.8948
16		8.5310	6.2262	5.2922	4.7726	4.4374	4.2016	4.0259	3.8896	3.7804
17		8.3997	6.1121	5.1850	4.6690	4.3359	4.1015	3.9267	3.7910	3.6822
18		8.2854	6.0129	5.0919	4.5790	4.2479	4.0146	3.8406	3.7054	3.5971
19		8.1849	5.9259	5.0103	4.5003	4.1708	3.9386	3.7653	3.6305	3.5225
20		8.0960	5.8489	4.9382	4.4307	4.1027	3.8714	3.6987	3.5644	3.4567
21		8.0166	5.7804	4.8740	4.3688	4.0421	3.8117	3.6396	3.5056	3.3981
22		7.9454	5.7190	4.8166	4.3134	3.9880	3.7583	3.5867	3.4530	3.3458
23		7.8811	5.6637	4.7649	4.2636	3.9392	3.7102	3.5390	3.4057	3.2986
24		7.8229	5.6136	4.7181	4.2184	3.8951	3.6667	3.4959	3.3629	3.2560
25		7.7698	5.5680	4.6755	4.1774	3.8550	3.6272	3.4568	3.3239	3.2172
26		7.7213	5.5263	4.6366	4.1400	3.8183	3.5911	3.4210	3.2884	3.1818
27		7.6767	5.4881	4.6009	4.1056	3.7848	3.5580	3.3882	3.2558	3.1494
28		7.6356	5.4529	4.5681	4.0740	3.7539	3.5276	3.3581	3.2259	3.1195
29		7.5977	5.4204	4.5378	4.0449	3.7254	3.4995	3.3303	3.1982	3.0920
30		7.5625	5.3903	4.5097	4.0179	3.6990	3.4735	3.3045	3.1726	3.0665
40		7.3141	5.1785	4.3126	3.8283	3.5138	3.2910	3.1238	2.9930	2.8876
60		7.0771	4.9774	4.1259	3.6490	3.3389	3.1187	2.9530	2.8233	2.7185
120		6.8509	4.7865	3.9491	3.4795	3.1735	2.9559	2.7918	2.6629	2.5586
∞		6.6349	4.6052	3.7816	3.3192	3.0173	2.8020	2.6393	2.5113	2.4073

CERTIFIED REFERENCE MATERIAL

TM-24.3, lot 0510

A trace element fortified calibration standard

Trace element standards are made in filtered and diluted Lake Ontario water and are preserved with 0.2% nitric acid. This fortified bulk CRM has concentrations in the high range and is designed for calibration checks. Trace element standards are noted for their integrity and consistency, and are monitored in additional Proficiency Testing (PT) studies. For information* values indicate insufficient data exists to meet CRM certification criteria. The values and statistics for this CRM are derived from PT studies 91, 93, and 95 dated March 2008, March 2009, and March 2010 respectively. A more detailed report on the methods used in our PT studies for specific parameters is available upon request. Please note that expiry dates of 1 year from the date of shipping are not indicative of sample stability, but rather of sample transport, handling and storage. We strongly recommend that the CRM be tightly capped and refrigerated immediately after use.

Element	Value ^a in µg/L	std ^b	C.I. ^c	Studies / Results (N)
Aluminum	34.4	3.2	0.6	3/87
Antimony	3.36	0.27	0.03	3/72
Arsenic	5.21	0.63	0.08	3/81
Barium	13.2	0.8	0.09	3/83
Beryllium	3.08	0.21	0.02	3/76
Bismuth	2.37	0.9	0.1	3/32
Boron	15.9	3	0.4	3/48
Cadmium	3.97	0.37	0.04	3/82
Chromium	5.01	0.49	0.05	3/85
Cobalt	6.29	0.5	0.06	3/87
Copper	8.79	0.84	0.07	3/89
Iron	15.4	4.2	0.5	3/83
Lead	8.82	0.45	0.06	3/78
Lithium	5.02	0.97	0.1	3/33
Manganese	8.12	0.72	0.08	3/85
Molybdenum	6.18	0.81	0.07	3/74
Nickel	6.12	0.81	0.07	3/78
Selenium	3.42	0.55	0.06	3/74
Strontium	110	6.2	0.87	3/85
Thallium	4.18	0.38	0.06	3/50
Tin	3.72	0.36	0.06	3/48
Titanium	7.3	0.85	0.11	3/82
Uranium	4.42	0.34	0.04	3/82
Vanadium	7.03	0.51	0.06	3/78
Zinc	23.5	3.8	0.37	3/83
For information				
Gallium	3.2	13 Results		
Rubidium	4.3	22 Results		
Silver	2.9	82 Results		

* Outliers of > 3 std. dev. excluded and are calculated with 'Robust Analysis' Annex C, ISO DIS 13528 2005(E).

^a 2-sigma limit for an individual measurement.

^c 95% confidence interval on the population mean (± 1.96) * \sqrt{N} .

Figura 7.1 - Material de referência certificado TM-24.3.

CERTIFIED REFERENCE MATERIAL

TM-26.3, lot 1107

A low level fortified sample for trace elements

Trace element standards are made in filtered and diluted Lake Ontario water and are preserved with 0.2% nitric acid. TM-26.3 has concentrations in the low range and is designed for verification of accuracy. Trace element standards are monitored for consistency in Environment Canada Proficiency Testing (PT) studies. "For Information" values indicate insufficient data exists to meet CRM certification criteria. The values and statistics for this CRM are derived from PT studies 81, 83, and 85 dated September 2003, December 2003, and December 2004 respectively. A more detailed report on the methods used in our PT studies for specific parameters is available upon request. Please note that expiry dates of 1 year from the date of shipping are not indicative of sample stability, but rather of sample transport, handling and storage. We strongly recommend that the CRM be tightly capped and refrigerated immediately after use.

Element	Value* in µg/L	±SD ^b	C.I. ^c	Studies / Results (N)
Aluminum	80	14	1.4	3 / 88
Antimony	2.7	0.82	0.07	3 / 67
Arsenic	7.0	1.0	0.10	3 / 79
Boron	25	2.4	0.20	3 / 80
Barium	3.4	0.50	0.08	3 / 84
Bromine	38	6.1	0.81	3 / 57
Cadmium	7.1	1	0.1	3 / 92
Chromium	12.3	1.3	0.14	3 / 86
Cobalt	8.1	1	0.12	3 / 77
Copper	13.4	1.9	0.2	3 / 92
Iron	21	3.0	0.44	3 / 87
Lead	10.8	1.2	0.13	3 / 82
Lithium	0.8	0.87	0.12	3 / 43
Manganese	17	1.4	0.14	3 / 80
Molybdenum	7.5	1.2	0.15	3 / 67
Nickel	10.2	1.3	0.14	3 / 82
Selenium	5.8	1.3	0.16	3 / 65
Strontium	95	7.5	0.84	3 / 76
Thallium	5.2	0.83	0.08	3 / 54
Tin	3.3	0.85	0.14	3 / 41
Titanium	6	0.85	0.08	3 / 54
Uranium	7.5	1	0.13	3 / 62
Vanadium	12.1	1.4	0.18	3 / 83
For Information				
Bismuth	3.3	33 results		
Deuterium	5.4	16 results		
Rubidium	10	21 results		
Silver	6.8	59 results		
Tungsten	8.4	12 results		
Zinc	30	83 results		

* Outliers of > 3 std. dev. excluded and are calculated with "Robust Analyzer" Annex C, ISO DIS 13526:2005(D).

^b 1 sigma limit for an individual measurement.

^c 95% confidence interval on the population mean (or a 1.96) × \sqrt{N} .



Figura 7.2 - Material de referência certificado TM-26.3.