



**NATHALIE GASPAR
FERREIRA**

**VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO PARA ANÁLISE DE
METAIS EM PEIXE POR TÉCNICAS COM PLASMA
INDUTIVAMENTE ACOPLADO**



**NATHALIE GASPAR
FERREIRA**

**VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO PARA ANÁLISE DE
METAIS EM PEIXE POR TÉCNICAS COM PLASMA
INDUTIVAMENTE ACOPLADO**

Relatório de estágio apresentado à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química, realizado sob a orientação científica da Doutora Lina Dulce Magalhães de Carvalho, Responsável pelo Laboratório de ICP do Laboratório Central de Análises da Universidade de Aveiro, da Doutora Maria Eduarda da Cunha Pereira, Professora associada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Eng. Carlos Vale, Investigador do CIIMAR do Porto.

Dedico este trabalho aos meus pais e irmão.

o júri

Presidente

Prof. Doutor Artur Manuel Soares da Silva
Professor catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutor Ricardo Jorge Neves Bettencourt da Silva
Investigador no Centro de Ciências e Materiais da Universidade de Lisboa

Prof.^a Doutora Maria Eduarda da Cunha Pereira
Professora associada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Em primeiro, agradeço aos meus pais e irmão por todo o esforço e apoio demonstrados para que conseguisse concluir esta etapa académica.

À Doutora Lina Carvalho e à Doutora Eduarda Pereira agradeço a oportunidade de realização deste estágio, assim como toda a ajuda despendida na realização do mesmo.

Agradeço ao Doutor Eugénio pelo tempo despendido no esclarecimento de algumas dúvidas e pela transmissão de conhecimentos acerca da técnica de ICP-MS.

Agradeço ao César e ao Rui pelo bom ambiente na sala e no laboratório e por toda a ajuda dispensada no esclarecimento de algumas questões que iam surgindo.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram e fizeram parte do meu percurso académico, nomeadamente professores, colegas e amigos.

palavras-chave

Validação de método analítico, qualidade dos alimentos, contaminantes, peixe, análise por ICP.

resumo

A alimentação deve ser equilibrada e variada, oferecendo todos os nutrientes necessários para colmatar as necessidades humanas e garantir uma vida saudável. Para garantir que os alimentos sejam seguros, estes devem estar isentos de contaminantes, pelo menos em quantidades tóxicas. É então importante monitorizar a qualidade e segurança dos alimentos a fim de avaliar os riscos e benefícios do seu consumo.

A quantificação da componente inorgânica em alimentos, i.e., dos elementos essenciais e dos potencialmente tóxicos, tem merecido poucos estudos apesar de ter um impacto relevante na saúde humana. Em Portugal são poucos os serviços acreditados prestados nesta área, e na literatura não há um consenso sobre a utilização de métodos de preparação de amostras.

O objetivo deste estágio consistiu em validar uma metodologia para a análise elementar de amostras de peixe, no Laboratório Central de Análises (LCA) da Universidade de Aveiro (UA), recorrendo a técnicas de análise multi-elementares tais como emissão ótica e espectrometria de massa associadas a plasma indutivamente acoplado (ICP-OES e ICP-MS). A validação destas metodologias teve como objetivo a sua posterior acreditação.

A matriz alimentícia escolhida para a realização deste trabalho foi o peixe. A escolha de apenas um tipo de matriz para a realização deste trabalho deveu-se a vários fatores, de entre os quais se destaca a necessidade de adotar diferentes estratégias de preparação de amostra e posterior análise, consoante a matriz alimentícia em questão, devido essencialmente à diferente composição que os alimentos possuem, o que introduz diferentes abordagens durante o processo de validação do método.

Na validação foram tidos em consideração diferentes parâmetros de desempenho, nomeadamente a seletividade, o limite de deteção, o limite de quantificação, a gama de trabalho, a sensibilidade analítica, a justeza, a precisão e a incerteza. Os resultados obtidos na análise de soluções padrão, materiais de referência e amostras de peixe cumpriram os requisitos de desempenho definidos no LCA.

Foram validadas as metodologias de quantificação de Mn e Sr por ICP-MS e de quantificação de Cu, Fe e Zn por ICP-OES, para a matriz peixe. A futura acreditação destas metodologias ficou condicionada pela participação com êxito num ensaio de comparação interlaboratorial.

keywords

Analytical method validation, food quality, contaminants, fish, analysis by ICP.

abstract

Food must be balanced and varied, providing all the necessary nutrients to bridge human needs and ensure a healthy life. To ensure that food is safe, it should be free of contaminants, at least in toxic amounts. It is therefore important to monitor the quality and safety of food in order to assess the risks and benefits of its consumption.

The quantification of inorganic component in food, i.e. of essential and potentially toxic elements, has received few studies despite having a significant impact on human health. In Portugal there are few accredited services in this area, and in the literature there is no consensus on the use of sample preparation methods. The aim of this Internship was to validate a method for elemental analysis in fish, in Laboratório Central de Análises (LCA) of University of Aveiro (UA), using multi-elementar analysis techniques such as Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-OES and ICP-MS). The validation of these methodologies aimed their subsequent accreditation.

The chosen food matrix for the achievement of this work was the fish. The choice of only one type of matrix for the achievement of this work was due to several factors among which highlights the need to adopt different sample preparation strategies and subsequent analysis, depending on the food matrix in question, essentially due to the different composition that they have, which introduces differences in the process of method validation.

In validation process it was evaluated different performance parameters, namely selectivity, the detection limit, the quantification limit, the work range, the analytical sensibility, trueness, precision and uncertainty. The results of the analysis of standards solutions, reference materials and fish samples met the performance requirements defined in the LCA.

In this work it was validated the methods of quantification of Mn and Sr by ICP-MS and quantification of Cu, Fe and Zn by ICP-OES for fish matrix. The future accreditation of these methodologies it is conditioned by successful participation in a interlaboratory comparison test.

Índice

Índice de figuras	xv
Índice de tabelas	xix
1. Introdução	1
1.1. O Laboratório Central de Análises da Universidade de Aveiro	1
1.2. Importância da qualidade e segurança alimentar	2
1.2.1. Quantificação de elementos essenciais e potencialmente tóxicos em alimentos	3
1.2.1.1. Preparação de amostras de produtos alimentares	4
1.3. O peixe na alimentação humana	12
1.3.1. Composição do peixe	15
1.3.2. Importância do peixe na alimentação	17
1.3.3. Metais e outros elementos em peixe (essencialidade vs toxicidade).....	19
1.3.4. Quantificação de elementos essenciais e potencialmente tóxicos em peixe .	22
1.3.5. Legislação sobre teores máximos de alguns elementos em peixe	23
1.3.6. Legislação relativa a métodos de análise e critérios de desempenho	26
1.4. Objetivos do trabalho de Estágio	29
2. Materiais e métodos.....	31
2.1. Lavagem do material	31
2.2. Equipamentos.....	31
2.3. Técnicas com plasma indutivamente acoplado utilizadas neste trabalho	32
2.3.1. Princípio de funcionamento do ICP-OES.....	32
2.3.2. Princípio de funcionamento do ICP-MS	35
2.3.3. Interferências nas técnicas de ICP	37
2.3.4. Algumas vantagens e limitações das técnicas com plasma	39
2.4. Reagentes e soluções	40
2.5. Preparação de amostras.....	41
2.6. Quantificação dos elementos de interesse por ICP	42
2.7. Desenvolvimento e validação de métodos de ensaio	43
2.7.1. Parâmetros de desempenho do método avaliados neste trabalho	44
2.7.2. Controlo de qualidade utilizado neste trabalho	63
3. Apresentação e discussão de resultados	65

3.1.	Validação do método de quantificação de Mn em peixe por ICP-MS	65
3.1.1.	Seletividade	65
3.1.2.	Limites de detecção e quantificação	67
3.1.3.	Quantificação	70
3.1.4.	Justeza / veracidade	73
3.1.5.	Precisão	75
3.1.6.	Incerteza da medição	79
3.1.7.	Resumo da validação dos métodos.....	80
4.	Conclusões	87
5.	Referências	89
6.	Anexos.....	97
6.1.	Validação do método de quantificação de Sr em peixe por ICP-MS	97
6.2.	Validação do método de quantificação de Cu em peixe por ICP-OES	105
6.3.	Validação do método de quantificação de Fe em peixe por ICP-OES	113
6.4.	Validação do método de quantificação de Zn em peixe por ICP-OES	121

Índice de figuras

Figura 1 – Pesca por captura e produção em aquacultura no mundo (FAO, 2014).....	12
Figura 2 – Produção e utilização de peixe no mundo (FAO, 2014).	13
Figura 3 – Consumo médio de peixe por indivíduo entre 2008-2010 (FAO, 2014).	14
Figura 4 – Músculo claro e escuro no peixe (Murray e Burt, 2001).	15
Figura 5 – Esquema de um equipamento de ICP-OES (Cazes, 2005).	33
Figura 6 – Esquema de uma fonte de plasma acoplado indutivamente (Hill, 2007).....	34
Figura 7 – Esquema de um equipamento de ICP-MS (Cazes, 2005).	35
Figura 8 – Esquema do analisador de massas de um ICP-MS – quadrupolo (Skoog et al., 2013).....	36
Figura 9 – Esquema de um multiplicador de elétrons com dínodos discretos (Hill, 2007). ..	37
Figura 10 – Relações entre tipos de erros, características de desempenho e a sua expressão quantitativa.	53
Figura 11 – Carta de controlo das percentagens de recuperação de Mn.	65
Figura 12 – Carta de verificação dos brancos de solução para o Mn.	67
Figura 13 – Carta de verificação dos brancos de digestão para o Mn.	67
Figura 14 – Carta de controlo do erro de justeza da quantificação de Mn no PVLQ.....	68
Figura 15 – Função de calibração para a quantificação do Mn no dia 27/04/2016.....	71
Figura 16 – Erro residual associado aos diferentes padrões de calibração para o Mn, no dia 27/04/2016.....	72
Figura 17 – Carta de controlo do erro de justeza na quantificação do Mn nos PVRCs.	73
Figura 18 – Carta de controlo do erro de justeza na quantificação do Mn no MRC.....	74
Figura 19 – Carta de controlo dos desvios padrões relativos (%) na quantificação de Mn por ICP-MS.....	75
Figura 20 – Carta de controlo para os valores das diferenças relativas (%) dos duplicados de leitura de amostras de peixe.....	77
Figura 21 – Carta de controlo para os valores das diferenças relativas (%) dos duplicados de digestão de amostras de peixe.	77
Figura 22 – Carta de controlo das percentagens de recuperação de Sr.	97
Figura 23 – Carta de verificação dos brancos de solução para o Sr.	97
Figura 24 – Carta de verificação dos brancos de digestão para o Sr.	98
Figura 25 – Carta de controlo do erro de justeza da quantificação de Sr no PVLQ.	98

Figura 26 – Função de calibração para a quantificação do Sr no dia 27/04/2016.....	100
Figura 27 – Erro residual associado aos diferentes padrões de calibração para o Sr, no dia 27/04/2016.....	100
Figura 28 – Carta de controlo do erro de justeza na quantificação do Sr nos PVRCs.....	101
Figura 29 – Carta de controlo do erro de justeza na quantificação do Sr no MRC.....	101
Figura 30 – Carta de controlo dos desvios padrões relativos (%) na quantificação do Sr por ICP-MS.....	101
Figura 31 – Carta de controlo para os valores das diferenças relativas (%) dos duplicados de leitura de amostras de peixe.	102
Figura 32 – Carta de controlo para os valores das diferenças relativas (%) dos duplicados de digestão de amostras de peixe.	102
Figura 33 – Carta de controlo das percentagens de recuperação de Cu.	105
Figura 34 – Carta de verificação dos brancos de solução para o Cu.....	106
Figura 35 – Carta de verificação dos brancos de digestão para o Cu.....	106
Figura 36 – Carta de controlo do erro de justeza da quantificação de Cu no PVLQ.	107
Figura 37 – Função de calibração para a quantificação do Cu no dia 06/04/2016.	108
Figura 38 – Erro residual associado aos diferentes padrões de calibração para o Cu, no dia 06/04/2016.....	109
Figura 39 – Carta de controlo do erro de justeza na quantificação do Cu nos PVRCs.....	109
Figura 40 – Carta de controlo do erro de justeza na quantificação do Cu no MRC.	109
Figura 41 – Carta de controlo dos desvios padrões relativos (%) na quantificação do Cu por ICP-OES.....	110
Figura 42 – Carta de controlo para os valores das diferenças relativas (%) dos duplicados de leitura de amostras de peixe.	110
Figura 43 – Carta de controlo para os valores das diferenças relativas (%) dos duplicados de digestão de amostras de peixe.	111
Figura 44 – Carta de controlo das percentagens de recuperação de Fe.....	113
Figura 45 – Carta de verificação dos brancos de solução para o Fe.	113
Figura 46 – Carta de verificação dos brancos de solução para o Fe.	113
Figura 47 – Carta de controlo do erro de justeza da quantificação de Fe no PVLQ.....	114
Figura 48 – Função de calibração para a quantificação do Fe no dia 06/04/2016.	115

Figura 49 – Erro residual associado aos diferentes padrões de calibração para o Fe, no dia 06/04/2016.....	116
Figura 50 – Carta de controlo do erro de justeza na quantificação do Fe nos PVRCs.....	116
Figura 51 – Carta de controlo do erro de justeza na quantificação do Fe no MRC.	117
Figura 52 – Carta de controlo dos desvios padrões relativos (%) na quantificação do Fe por ICP-OES.	117
Figura 53 – Carta de controlo para os valores das diferenças relativas (%) dos duplicados de leitura de amostras de peixe.....	118
Figura 54 – Carta de controlo para os valores das diferenças relativas (%) dos duplicados de digestão de amostras de peixe.	118
Figura 55 – Carta de controlo das percentagens de recuperação de Zn.	121
Figura 56 – Carta de verificação dos brancos de solução para o Zn	122
Figura 57 – Carta de verificação dos brancos de digestão para o Zn	122
Figura 58 – Carta de controlo do erro de justeza da quantificação de Zn no PVLQ.....	123
Figura 59 – Função de calibração para a quantificação do Zn no dia 06/04/2016.....	124
Figura 60 – Erro residual associado aos diferentes padrões de calibração para o Zn, no dia 06/04/2016.....	125
Figura 61 – Carta de controlo do erro de justeza na quantificação do Zn nos PVRCs.	125
Figura 62 – Carta de controlo do erro de justeza na quantificação do Zn no MRC.....	125
Figura 63 – Carta de controlo dos desvios padrões relativos (%) na quantificação do Zn por ICP-OES.....	126
Figura 64 – Carta de controlo para os valores das diferenças relativas (%) dos duplicados de leitura de amostras de peixe.....	126
Figura 65 – Carta de controlo para os valores das diferenças relativas (%) dos duplicados de digestão de amostras de peixe.	127

Índice de tabelas

Tabela 1 – Métodos de preparação de amostras de alimentos para análise de elementos essenciais e potencialmente tóxicos.	8
Tabela 2 – Quantidades mundiais para capturas, produção em aquacultura e utilização dos produtos de pesca (FAO, 2014).....	13
Tabela 3 – Valores de referência dietéticos diários, máximos diários toleráveis para alguns elementos e valores máximos permitidos pela legislação na parte comestível do peixe. ...	25
Tabela 4 – Critérios de desempenho para métodos de análise de chumbo, cádmio e mercúrio em peixe.....	28
Tabela 5 – Desvio padrão relativo estimado a partir da equação de Horwitz, na concentração de interesse.	28
Tabela 6 – Comparação de algumas características de técnicas de análise elementar.	40
Tabela 7 – Esquema da tabela ANOVA utilizada neste trabalho (EURACHEM, 2014)...	58
Tabela 8 – Limite de detecção e de quantificação do Mn.	68
Tabela 9 – Valores para a definição da função de calibração linear ponderado do Mn do dia 27/04/2016.....	70
Tabela 10 – Valores para a definição da função de calibração linear ponderado do Mn do dia 27/04/2016 (continuação).....	70
Tabela 11 – Valor do erro residual (%) para o Mn nos padrões de calibração.	71
Tabela 12 – Parâmetros das funções de calibração obtidas para o Mn.	71
Tabela 13 – Valores de $CVr(\%)$ e de $HORRATr$ estimados para o Mn.....	76
Tabela 14 – Valores de $CVSI \%$ e de $HORRATSI$ estimados para o Mn.....	78
Tabela 15 – Estimativa da incerteza associada à quantificação do Mn por ICP-MS.	79
Tabela 16 – Parâmetros de desempenho para a quantificação de Mn em peixe por ICP-MS.	82
Tabela 17 – Parâmetros de desempenho para a quantificação de Sr em peixe por ICP-MS.	83
Tabela 18 – Parâmetros de desempenho para a quantificação de Cu em peixe por ICP-OES.	84
Tabela 19 – Parâmetros de desempenho para a quantificação de Fe em peixe por ICP-OES.	85

Tabela 20 – Parâmetros de desempenho para a quantificação de Zn em peixe por ICP-OES.	86
Tabela 21 – Limite de detecção e de quantificação do Sr.....	98
Tabela 22 – Valores para a definição da função de calibração linear ponderado do Sr do dia 27/04/2016.....	99
Tabela 23 – Valores para a definição da função de calibração linear ponderado do Sr do dia 27/04/2016 (continuação).....	99
Tabela 24 – Valor do erro residual (%) para o Sr nos padrões de calibração.	99
Tabela 25 – Parâmetros das funções de calibração obtidas para o Sr.	100
Tabela 26 – Valores de $CVr(\%)$ e de $HORRATr$ estimados para o Sr.	102
Tabela 27 – Valores de $CVSI \%$ e de $HORRATSI$ estimados para o Sr.	103
Tabela 28 – Estimativa da incerteza associada à quantificação do Sr por ICP-MS.....	103
Tabela 29 – Valores das leituras efetuadas dos padrões de Fe e Ca para o estudo de interferências espectrais na quantificação de Cu ($\mu\text{g/L}$) por ICP-OES.....	105
Tabela 30 – Limite de detecção e de quantificação do Cu.....	106
Tabela 31 – Valores para a definição da função de calibração linear ponderado do Cu do dia 06/04/2016.....	107
Tabela 32 – Valores para a definição da função de calibração linear ponderado do Cu do dia 06/04/2016 (continuação).....	107
Tabela 33 – Valor do erro residual (%) para o Cu nos padrões de calibração.	108
Tabela 34 – Parâmetros das funções de calibração obtidas para o Cu.	108
Tabela 35 – Valores de $CVr(\%)$ e de $HORRATr$ estimados para o Cu.	110
Tabela 36 – Valores de $CVSI \%$ e de $HORRATSI$ estimados para o Cu.	111
Tabela 37 – Estimativa da incerteza associada à quantificação do Cu por ICP-OES.....	111
Tabela 38 – Limite de detecção e de quantificação do Fe.	114
Tabela 39 – Valores para a definição da função de calibração linear ponderado do Fe do dia 06/04/2016.....	114
Tabela 40 – Valores para a definição da função de calibração linear ponderado do Fe do dia 06/04/2016 (continuação).....	115
Tabela 41 – Valor do erro residual (%) para o Fe nos padrões de calibração.....	115
Tabela 42 – Parâmetros das funções de calibração obtidas para o Fe.....	116
Tabela 43 – Valores de $CVr(\%)$ e de $HORRATr$ estimados para o Fe.	117

Tabela 44 – Valores de <i>CVSI</i> % e de <i>HORRATSI</i> estimados para o Fe.	118
Tabela 45 – Estimativa da incerteza associada à quantificação do Fe por ICP-OES.	119
Tabela 46 – Valores das leituras efetuadas dos padrões de Cu e Fe para o estudo de interferências espectrais na quantificação de Zn ($\mu\text{g/L}$) por ICP-OES	121
Tabela 47 – Limite de detecção e de quantificação do Zn.	122
Tabela 48 – Valores para a definição da função de calibração linear ponderado do Zn do dia 06/04/2016.	123
Tabela 49 – Valores para a definição da função de calibração linear ponderado do Zn do dia 06/04/2016 (continuação).	123
Tabela 50 – Valor do erro residual (%) para o Zn nos padrões de calibração.	124
Tabela 51 – Parâmetros das funções de calibração obtidas para o Zn.	124
Tabela 52 – Valores de <i>CVr</i> (%) e de <i>HORRATr</i> estimados para o Zn.	126
Tabela 53 – Valores de <i>CVSI</i> % e de <i>HORRATSI</i> estimados para o Zn.	127
Tabela 54 – Estimativa da incerteza associada à quantificação do Zn por ICP-OES.	127

1. Introdução

1.1. O Laboratório Central de Análises da Universidade de Aveiro

O trabalho apresentado neste documento refere-se a um estágio realizado no Laboratório Central de Análises (LCA) da Universidade de Aveiro (UA), no âmbito do Mestrado em Química.

O LCA é uma unidade executiva da UA responsável pela execução e fornecimento de serviços de qualidade aos investigadores da UA, garantindo-lhes ainda apoio científico e técnico nas suas áreas de competência e pela prestação de serviços qualificados a entidades públicas e privadas, otimizando e rentabilizando os recursos instrumentais e as competências disponíveis no LCA e na Universidade em geral (UA, 2015a).

O LCA possui vários serviços: análise química por ICP (técnica instrumental de análise com plasma indutivamente acoplado), difração de raios-X (DRX), caracterização isotópica de matrizes naturais e sintéticas por espectrometria de massa de ionização térmica (TIMS) e diagnóstico molecular para aquaculturas (DMA) (UA, 2016).

Este estágio foi realizado no serviço de ICP. Este serviço permite a análise simultânea da maioria dos elementos da tabela periódica em várias matrizes analíticas. Para esse efeito o laboratório está munido de dois equipamentos com plasma indutivamente acoplado: um espetrómetro de massa (ICP-MS) *Thermo X Series* e um espetrómetro de emissão ótica (ICP-OES) *Jobin Yvon Activa M*. O laboratório possui ainda um laboratório químico que serve de apoio ao laboratório de ICP e onde se podem realizar as digestões e preparações de amostras. Este laboratório químico está equipado com todo o material necessário para o efeito (UA, 2015a).

No seguimento de um processo iniciado em 2010, o LCA possui desde fevereiro de 2013 o estatuto de laboratório acreditado pelo Instituto Português da Acreditação (IPAC). A acreditação garante que a sua competência técnica e de gestão está devidamente reconhecida, pelo IPAC, para a realização de ensaios químicos usando técnicas de ICP. A acreditação foi concedida após a realização de uma auditoria de concessão, realizada no LCA em outubro de 2012, segundo a Norma NP EN ISO/IEC 17025. O IPAC é membro da infraestrutura europeia de acreditação, a *European cooperation for Accreditation* (EA), bem como das estruturas mundiais de Acreditação, a *International Laboratory Accreditation Cooperation* (ILAC) e o *International Accreditation Forum* (IAF), e por isso reconhecido internacionalmente.

O laboratório ao cumprir os requisitos da norma NP EN ISO/IEC 17025, para as suas atividades de ensaio, garante também que o seu sistema de gestão da qualidade satisfaz os princípios da norma ISO 9001 (UA, 2013).

Em fevereiro de 2015, o IPAC concedeu ao LCA a possibilidade de acreditar a análise de qualquer elemento em águas naturais, de consumo humano e em solos, por ICP- OES e ICP-MS, segundo a norma NP EN ISO/IEC 17025 (UA, 2015b).

1.2. Importância da qualidade e segurança alimentar

O mercado internacional de alimentos já existe há muitos anos, mas inicialmente os alimentos eram produzidos, vendidos e consumidos localmente. Ao longo do século passado, a quantidade de alimentos comercializados internacionalmente cresceu exponencialmente, e uma enorme quantidade e variedade de alimentos é hoje transportada em todo mundo. Devido a esta distribuição global dos alimentos, é importante avaliar a sua qualidade e equidade pois os consumidores necessitam de ter confiança na qualidade dos produtos alimentares que compram e consomem e os importadores têm de confiar que os alimentos que importam estão de acordo com as especificações de segurança estabelecidas, ou seja e caso exista, com a legislação em vigor (Codex Alimentarius, 2015).

O acesso a alimentos nutricionalmente adequados e seguros é um direito básico do ser humano (FAO/WHO, 1992). A alimentação deve ser equilibrada e variada, oferecendo todos os nutrientes necessários para colmatar as necessidades humanas e garantir a sua saúde; uma obtenção inadequada de calorias, de macronutrientes (lípidos, proteínas, hidratos de carbono), e de micronutrientes (vitaminas, minerais) pode resultar em doença ou até levar à morte. Por vezes os alimentos podem ser uma fonte de doença, associada à ingestão de alimentos contaminados.

Na literatura nem sempre há um consenso relativamente ao uso dos termos qualidade e segurança alimentar. A qualidade dos alimentos pode ser definida como o grau de excelência dos alimentos e inclui todas as características que são relevantes e tornam os alimentos aceitáveis para consumo humano, englobando fatores como o sabor, a aparência e a qualidade nutricional, bem como a qualidade bacteriológica. Algumas propriedades dos alimentos, como a qualidade nutricional, podem ser quantificadas através de análises químicas (Vaclavik e Christian, 2008).

O termo segurança alimentar é usado para avaliar o grau de segurança com que os alimentos podem ser consumidos sem provocar danos na saúde humana. As condições associadas à segurança alimentar incluem a origem dos alimentos, as práticas relativas à sua rotulagem, higiene durante a manipulação dos mesmos, presença ou não de aditivos e resíduos de pesticidas, bem como as políticas e orientações governamentais para a gestão da importação e exportação, da inspeção e dos sistemas de certificação de alimentos (Vaclavik e Christian, 2008).

Uma variedade de compostos químicos indesejados pode entrar na nossa cadeia alimentar, por meio de adição intencional ou não, em diferentes fases da mesma e tornar alguns alimentos inseguros para consumo. Como exemplo, refira-se o desastre de Minimata, no Japão, no qual houve intoxicação aguda com metilmercúrio, devido às elevadas concentrações de mercúrio presentes no peixe que tornaram este alimento inseguro para consumo (Ekino et al., 2007). A monitorização da exposição a estes compostos tornou-se essencial para garantir a segurança no fornecimento alimentar.

No primeiro editorial publicado no *Journal of Food Composition and Analysis*, em dezembro de 1987, Kent Stewart escreveu: “A dieta humana é o principal veículo para a nossa interação com o ambiente. É a principal fonte de nutrientes e pode ser uma importante fonte de exposição humana aos agentes infecciosos, tóxicos, e farmacológicos” (Stewart, 1987). De facto, na análise da composição de alimentos estão em causa não só os nutrientes da dieta humana, mas também contaminantes e outros elementos potencialmente perigosos (Burlingame e Pineiro, 2007; Burlingame, 2001).

1.2.1. Quantificação de elementos essenciais e potencialmente tóxicos em alimentos

Os alimentos são a fonte primária de elementos essenciais para os seres humanos, mas também uma potencial fonte de exposição a elementos tóxicos. Para que os elementos essenciais sejam benéficos para a saúde humana, estes devem encontrar-se numa determinada gama de concentrações, uma vez que acima de determinadas concentrações podem apresentar riscos para a saúde. Portanto, a essencialidade/toxicidade é sempre uma função da concentração. Neste contexto, os níveis de elementos essenciais e tóxicos devem ser determinados rotineiramente em produtos alimentares.

O conhecimento da composição elementar dos alimentos requer preparação da amostra antes da sua análise (Korn et al., 2008). Existe uma enorme variedade de alimentos

(diferentes matrizes alimentícias), existem vários métodos de análise (instrumentais) e existem também vários métodos de preparação da amostra. O método de preparação da amostra deve ser bem escolhido para se alcançarem os melhores resultados no menor tempo possível, com contaminações ou perdas de analito mínimas e baixo consumo de reagentes. Têm sido descritos na literatura, vários métodos de preparação de amostras de alimentos para posterior análise elementar, sendo os métodos mais utilizados os métodos de espectrometria de absorção atômica de chama (F-AAS), espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite (GF-AAS), espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). Apesar destas técnicas terem demonstrado um progresso constante na sensibilidade de detecção, a preparação da amostra é reconhecida como um ponto crítico e uma fonte de erro importante no desenvolvimento do método analítico (Hoenig, 2001; Korn et al., 2008).

1.2.1.1. Preparação de amostras de produtos alimentares

A determinação da concentração de analitos em diferentes tipos de amostras de alimentos não é uma tarefa simples e diversos fatores devem ser considerados para minimizar a incerteza associada à preparação das amostras, de modo a obter resultados confiáveis. Na maioria dos casos dos produtos alimentares é necessário efetuar preparação da amostra, convertendo-a numa amostra homogênea ou isolar o analito de interesse antes da análise. Os procedimentos para a preparação de amostras de alimentos podem ser classificados em função do tipo de matriz a ser analisada, do analito a ser medido e da instrumentação utilizada. Devido à complexidade da matriz alimentar, podem ter-se efeitos de interferência de matriz, uma vez que esta possui uma grande variedade de compostos que poderão influenciar a análise do analito em estudo. Em alguns artigos descritos na literatura, os procedimentos de preparação da amostra são realizados para remover as espécies que podem causar interferências ou para pré-concentrar o analito em estudo antes da sua análise (Hoenig, 2001; Korn et al., 2008).

Existem diversas técnicas de preparação de amostras para análise de elementos em alimentos, sendo que as que são referidas na bibliografia com maior frequência são a calcinação seguida de diluição do resíduo daí proveniente em ácido e a digestão com ácidos concentrados, de preferência assistida por micro-ondas. Segue-se uma breve apresentação

de alguns exemplos mais utilizados na preparação de amostras de alimentos utilizando técnicas de espectrometria.

A calcinação é um método de preparação simples, normalmente utilizado para a quantificação elementar em alimentos. Este processo é baseado na degradação de amostras a temperaturas elevadas e à pressão ambiente, onde a amostra é colocada num recipiente aberto para remover a matéria orgânica por decomposição térmica, geralmente na presença de um auxiliar de calcinação e utilizando uma mufla. Nesta operação são utilizadas temperaturas na ordem dos 450 a 550°C e o resíduo resultante é dissolvido num ácido apropriado. Este método apresenta algumas vantagens, tais como a possibilidade de utilizar uma massa de amostra superior à de outras metodologias, e a dissolução do resíduo resultante num volume de ácido pequeno, o que permite a pré-concentração dos elementos de interesse na solução final. Permite também a destruição completa da matéria orgânica, que é um pré-requisito para algumas técnicas analíticas, simplificando a matriz da amostra, podendo este método ser aplicado a uma grande variedade de alimentos. Contudo, a elevada temperatura pode fazer com que ocorram perdas por volatilização de alguns elementos mais voláteis. A adição de um auxiliar de calcinação aumenta o teor de sais inorgânicos, o que pode ser um problema para a determinação subsequente dos elementos e pode também contribuir para a contaminação, sendo necessário a realização de brancos de controlo. A calcinação também expõe a amostra a contaminação por via da atmosfera (Hoenig, 2001; Korn et al., 2008).

A metodologia de calcinação tem sido aplicada na quantificação de elementos tais como Mn, Fe, Cu, Zn, Cr, Cd, Pb e Ni em diversos alimentos, nomeadamente banana, melancia, laranja, maçã, tomate, cebola, espinafre, folhas de abóbora, batata-doce, soja, feijão, amendoim, arroz, milho e trigo utilizando como técnica de análise a espectrometria de absorção atómica de chama (Akinyele e Shokunbi, 2015). Elementos como o Fe, Pb e Hg podem ser perdidos por volatilização e, neste caso, deve ser aplicado um método de calcinação alternativo que use temperaturas mais baixas. O resíduo é, na maioria dos casos, dissolvido em HCl ou HNO₃ antes da análise (Hoenig, 2001; Korn et al., 2008).

Outras metodologias para efetuar a preparação das amostras incluem métodos de digestão que utilizam ácidos concentrados ou misturas de ácidos. Esta digestão pode ser realizada em vaso aberto com aquecimento, por exemplo, numa placa de aquecimento, ou em vaso fechado com auxílio de um sistema de micro-ondas. A digestão assistida por micro-ondas é um método apelativo, especialmente para pequenas quantidades de amostra, pois o

aquecimento por esta via apresenta vantagens relativamente ao aquecimento em placa, devido ao facto de a energia ser gerada na mistura de digestão e não transferida por condução. As principais vantagens da digestão assistida por micro-ondas são os tempos de digestão, que são curtos comparados com os da digestão efetuada em placa de aquecimento ou pelo método de calcinação, e a menor quantidade de reagentes necessários para obter uma digestão completa. Uma das limitações do processo de digestão com micro-ondas é o tempo necessário para o arrefecimento antes dos vasos poderem ser abertos, devido a possíveis perdas dos analitos por volatilização, semelhante ao que acontece no processo de calcinação. Em geral, os reagentes que podem ser utilizados para a decomposição de amostras neste processo são HNO_3 , HCl , H_2SO_4 , H_3PO_4 , HClO_4 , HF e H_2O_2 , sendo que o HNO_3 e o H_2O_2 são os mais utilizados. O HNO_3 concentrado é o oxidante mais favorável para a destruição da matéria orgânica, mas, devido ao baixo potencial de oxidação, pode levar a uma digestão incompleta de algum tipo de amostras. Como tal, por vezes utilizam-se misturas de reagentes para auxiliar e tornar mais eficaz o processo de digestão. Os reagentes utilizados no processo de preparação de amostras devem ser tidos em consideração antes da análise, pois podem afetar a posterior etapa de quantificação. É de conhecimento geral que nas técnicas de espectrometria o HNO_3 é o reagente mais adequado. Apesar de ocasionalmente se observar supressão do sinal na sua presença (por exemplo, na espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado), não são encontrados problemas analíticos relevantes com concentrações inferiores a 10% (Hoenig, 2001; Korn et al., 2008). Esta metodologia de preparação da amostra foi utilizada para quantificar os níveis de Zn, Cu, Cd, Pb, Ni e Cr em géneros alimentícios tal como o repolho, trigo, batata, leite instantâneo, peixe, ovos e alimentos para bebés por espectrometria de absorção atómica (Milačić e Kralj, 2003). Maciel et al. (2014) desenvolveram um método baseado na digestão induzida por micro-ondas para o tratamento de peixe e subsequente determinação de As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Zn, Se por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado. Jarapala et al. (2014) determinaram os níveis de Mn, Zn, Cr, Co, Cu, e Se em amostras de peixe por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, usando HNO_3 e H_2O_2 e aquecimento por micro-ondas. Outros exemplos de procedimentos de digestão de amostras de alimentos são apresentados na Tabela 1.

Consoante a matriz alimentícia em análise, pode ser necessário utilizar métodos de digestão mais ou menos agressivos, sendo possível variar parâmetros de digestão como os

reagentes utilizados, as temperaturas e o tempo de digestão. As interferências na detecção, de determinado analito, também variam consoante a matriz alimentícia em estudo uma vez que os alimentos possuem diferentes composições, e como tal, poderá ser necessário variar as técnicas utilizadas para a sua detecção.

Tabela 1 – Métodos de preparação de amostras de alimentos para análise de elementos essenciais e potencialmente tóxicos.

Alimento	Método de preparação	Reagentes	Elementos analisados	Técnica de detecção	Referência
Peixes e crustáceos	Micro-ondas	HNO ₃ e H ₂ O ₂	Cr, Zn, Mn, Ba, Pb, Co, Cu, Zn, Cd	ICP-MS	(Jebakumar et al., 2015)
Peixe	Micro-ondas	HNO ₃ e H ₂ O ₂	Cd, Pb, Cr, Ni, Cu, Zn, Fe, Mn	AAS	(Gu et al., 2015)
Peixe (fígado, pele e músculo)	Micro-ondas	HNO ₃ e H ₂ O ₂ HNO ₃ e H ₂ SO ₄	Cd, Co, Cu, Ni, Pb, Fe, Hg	CV-AAS	(Hosseini et al., 2015)
Peixe (músculo e fígado)	Micro-ondas	HNO ₃	Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb, Ni, Zn	ICP-OES	(Ates et al., 2015)
Moluscos e peixes	Micro-ondas	HNO ₃ e H ₂ O ₂	Pb, Cd, Hg	ICP-MS	(Miedico et al., 2015)
Atum em conserva	Micro-ondas	HNO ₃ e H ₂ O ₂	Hg, Pb, Cd, As	DMA, GF-AAS, HG-AAS	(Andayesh et al., 2015)
Peixe e vegetais	Micro-ondas	HNO ₃ e H ₂ O ₂	Cr, Ni, Cu, As, Cd, Pb	ICP-MS	(Islam et al., 2015)
Peixe	Micro-ondas	HNO ₃ e H ₂ O ₂	Al, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Zn, Se, Ga, Te	ICP-AES	(Mert et al., 2014)
Peixe	Micro-ondas	HNO ₃ e HCl	Fe, Zn, Mn, Cu, Cr, Cd, Pb, Hg	ICP-OES, GF- AAS, CV-AAS	(Velusamy et al., 2014)
Peixe	Micro-ondas	HNO ₃	As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Se, Zn	ICP-MS	(Maciel et al., 2014)
Peixe	Micro-ondas	HNO ₃ e H ₂ O ₂	Fe, Ni, Cu, Zn, Cd Co, Cr e Pb	F-AAS	(Said et al., 2014)
Peixe	Micro-ondas	HNO ₃ e H ₂ O ₂	Mn, Zn, Cr, Co, Cu, Se	ICP-MS	(Jarapala et al., 2014)
Músculos e ossos de peixes	Micro-ondas	HNO ₃ , H ₂ O ₂ e HF	As, Cd, Hg, Pb, Cu, Zn, Se	ICP-OES	(Perugini et al., 2014)
Fígado, músculo e brânquias de peixes, de diferentes níveis tróficos	Micro-ondas	HNO ₃ e H ₂ O ₂	As, B, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Li, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, Sr, Zn	ICP-OES	(Subotić et al., 2013)
Peixe (fígado, brânquias, músculo)	Micro-ondas	HNO ₃ e H ₂ O ₂	Cu, Cd, Zn, Pb, Ni	ICP-MS	(Taweel et al., 2013)
Peixe (fígado, músculo e brânquias)	Micro-ondas	HNO ₃ e H ₂ O ₂	Cd, Hg, Cr, Pb, Se, As	GF-AAS, HG- AAS	(Dsikowitzky et al., 2013)
Peixe e marisco	Micro-ondas	HNO ₃ e H ₂ O ₂	As, Cd, Cr, Pb, Mn, Ni, V, Zn	ICP-MS	(Copat et al., 2013)
Peixe	Micro-ondas	HNO ₃ e H ₂ O ₂	Pb, Cd, Hg	GF-AAS, ETA- AAS, DMA	(Squadrone et al., 2013)
Grãos, legumes, frutas, peixes, moluscos,	Micro-ondas	HNO ₃ e H ₂ O ₂	Pb, Cd, Hg	ICP-MS, DMA	(Kim et al., 2012)

crustáceos, algas, produtos de feijão, carnes e ovos					
Peixe (músculo, guelras, pele, intestino e fígado)	Micro-ondas	HNO ₃ e H ₂ O ₂	Cu, Zn, Mn, Fe, Co, Ca, Mg	ICP-OES	(Uysal, 2011)
Peixe	Micro-ondas	HNO ₃ e HF	Cr, Cd, Hg, Cu, Zn, Pb, As	ICP-MS, ICP-OES, AFS	(Yi et al., 2011)
Peixe (músculo, pele, guelras, fígado e intestino)	Micro-ondas	HNO ₃ e H ₂ O ₂	Cu, Zn, Mn, Fe, Co, Mg, Ni, Cr, B, Cd	ICP-OES, GF-AAS	(Uysal et al., 2009)
Peixe	Micro-ondas	HNO ₃ e H ₂ O ₂	Hg, As, Pb, Cd, Ni, Fe, Cu, Mn, Zn, Se, Cr	F-AAS, GF-AAS, CV-AAS	(Tuzen, 2009)
Arroz, feijão, ovo, carne, peixe, pão, açúcar, vegetais, queijo, leite em pó, manteiga, trigo, pera, castanha do Brasil, café, chocolate, biscoitos e massas	Micro-ondas	HNO ₃ e H ₂ O ₂	Se, Pb, Cd, Mn, Co, Zn, Cu, Sr, Mo, V, Mg, Hg, Al, As, Cr, Ni	ICP-MS CV-AAS	(Nardi et al., 2009)
Organismos aquáticos invertebrados e peixe	Micro-ondas	HNO ₃	Zn, As, Se, Cd, Hg, Pb	ICP-MS	(Taylor et al., 2008)
Azeitonas	Micro-ondas	HNO ₃ e H ₂ O ₂	Mg, Cr, Co, Ni, Fe, Cu, Zn, Sn, Cd, Pb	ICP-MS	(Sahan et al., 2007)
Peixe, crustáceos e produtos de peixe	Micro-ondas	HNO ₃ e H ₂ O ₂	Cd, Pb, Cr, Zn, Cu, Co, Mn, Ni, As, Se, Hg	F-AAS, HG-AAS, CV-AAS	(Sivaperumal et al., 2007)
Dieta total (comida)	Micro-ondas	HNO ₃	Li, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Se, Mo, Na, Mg, Ca, Al, As, Cd, Pb, Hg, Sb	ICP-MS	(Leblanc et al., 2005)
Peixe enlatado	Micro-ondas	HNO ₃ e H ₂ O ₂	Hg, Ag, As, Cd, Cr, Fe, Pb, Mn, Ni, Co, Cu, Sn, V, Zn	ICP-OES DMA	(Ikem e Egiebor, 2005)
Vários alimentos	Micro-ondas	HNO ₃ e HF	Zn, Cu, Cd, Pb, Cr, Ni	F-AAS, ETA-AAS	(Zuliani et al., 2005)
Repolho, trigo, batata, leite instantâneo, peixe, ovos e alimentos para bebés	Micro-ondas	HNO ₃ e HF	Zn, Cu, Cd, Pb, Ni, Cr	F-AAS, ETA-AAS	(Milačić e Kralj, 2003)
Refeições	Micro-ondas	HNO ₃	Li, Na, Mg, Al, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Mo, Cd, Sn, Sb, Hg, Pb	ICP-MS	(Noël et al., 2003)
Verduras, legumes, cereais, tubérculos, frutas, peixe e	Micro-ondas (amostras com um	HNO ₃ e H ₂ O ₂	As, Cd, Hg, Pb	ICP-MS, AAS	(Llobet et al., 2003)

marisco, carne, ovos, leite, produtos lácteos e gorduras e óleos	baixo teor de água foram primeiro calcinadas)				
Leite em pó e líquido (crianças)	Micro-ondas	HNO ₃	Ca, Co, Cu, Cr, Fe, Mg, Mn, Mo, Na, Zn, Ag, Al, As, Ba, Be, Cd, Hg, Ni, Pb, Sb, Sn, Sr, Ti, Tl, U, V	ICP-OES	(Ikem et al., 2002)
Cogumelos selvagens	Micro-ondas	HNO ₃ e H ₂ O ₂	K, P, Mg, Na, Zn, Ca, Fe, Cu, Mn, Rb, Ag, Cd, Hg, Pb, Cs, Sr, Al, Si, Tl, In, Bi, Th, U, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, La, Lu, Ba	ICP-MS ICP-OES	(Falandysz et al., 2001)
Peixe	Micro-ondas	HNO ₃	Cd, Pb	GF-AAS	(Sures et al., 1995)
Café	Calcinação	HCl	Ca, Mg, K, Na, P, Co, Mn, Fe, Cr, Ni, Zn, Cu, Cd, Pb	F-AAS	(Grembecka et al., 2007)
Vinho	Sem tratamento	HNO ₃ para baixar o pH	(artigo de revisão – vários elementos)	F-AAS, GF-AAS, ICP-OES	(Aceto et al., 2002)
Peixe (músculo, brânquias, rim e fígado)	Vaso aberto, aquecimento convencional	HClO ₄ , HNO ₃ e H ₂ SO ₄	Fe, Mn, Cu, Cr, Pb, Zn, Ni	AAS	(Dhanakumar et al., 2015)
Peixe (músculo e pele)	Vaso aberto, aquecimento convencional	HNO ₃ e H ₂ O ₂	Ag, Al, As, B, Ca, Cd, Cu, Fe, Li, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb, Sb, Se, Si, Sn, Sr, Zn	ICP-OES	(Abadi et al., 2015)
Conservas de peixe (cavala, sardinha e atum)	Vaso aberto, aquecimento convencional	HNO ₃ , HClO ₄ , H ₂ O ₂ e HCl	Cd, Pb, Ni, Cr, Cu, Co, Fe, Mn, Zn	F-AAS	(Iwegbue, 2015)
Músculo de peixe	Vaso aberto, aquecimento convencional	HNO ₃ , H ₂ O ₂	Cu, Pb, Co, Ni, Cr, Mn, Cd, Fe	F-AAS	(Duran et al., 2014)
Peixe e camarão	Vaso aberto, aquecimento convencional	HNO ₃ e HClO ₄	As, Cd, Cu, Fe, Pb, Ni, Zn, Cr, Co, Sr	ICP-MS	(Giri e Singh, 2014)
Vários alimentos do mar	Vaso aberto, aquecimento convencional	HNO ₃ e H ₂ O ₂	Al, Cu, Cd, Fe, Mn, Zn	ICP-OES	(Fraser et al., 2013)
Camarão	Vaso aberto	HNO ₃ e HClO ₄	Cd	GF-AAS	(Rahimi et al., 2012)

Alimentos para animais de estimação (gato e cão)	Vaso aberto, aquecimento convencional	HNO ₃ e H ₂ O ₂	Cu, Ni, Pb, Fe, Mn, Cr, Cd	F-AAS	(Duran et al., 2010)
<i>Red mould rice (Monascus)</i>	Vaso aberto, aquecimento convencional	HNO ₃	As, Cd, Cr, Pb, Se, Cu, Zn	ICP-MS	(Tsai et al., 2010)
Peixe	Vaso aberto, aquecimento convencional	HNO ₃ e H ₂ O ₂	Cd, Ni, Cr, Zn, Cu, Pb	F-AAS	(Yildirim et al., 2009)
Nozes	Vaso aberto, aquecimento convencional	HNO ₃ , H ₂ SO ₄ e H ₂ O ₂	Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Zn, Al, Ba, Cd, Pb	ICP-OES	(Momen et al., 2007)
Peixe (músculo, brânquias e fígado)	Vaso aberto, aquecimento convencional	HNO ₃	Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Zn	ICP-OES	(Yılmaz et al., 2007)
Peixe (músculo, brânquia, fígado e gônadas)	Vaso aberto, aquecimento convencional	HNO ₃ e HClO ₄	Cd, Pb, Cu, Zn, Fe	F-AAS, GF-AAS	(Dural et al., 2007)

AAS - Espectrometria de absorção atômica (do inglês, *Atomic Absorption Spectrometry*); **AFS** - Espectrometria de fluorescência atômica (do inglês, *Atomic Fluorescence Spectrometry*); **CV-AAS** – Espectrometria de absorção atômica de vapor frio (do inglês, *Cold Vapour Atomic Absorption Spectrometry*); **DMA** - Análise direta de mercúrio (do inglês, *Direct Mercury Analyser*); **ETA-AAS** – Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (do inglês, *Electrothermal Atomisation Atomic Absorption Spectrometry*); **F-AAS** - Espectrometria de absorção atômica de chama (do inglês, *Flame Atomic Absorption Spectrometry*); **GF-AAS** - Espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite (do inglês, *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*); **HG-AAS** – Espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (do inglês, *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*); **ICP-MS** - Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (do inglês, *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*); **ICP-OES** - Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (do inglês, *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*).

1.3. O peixe na alimentação humana

O peixe desempenha um papel importante na luta contra a fome e a desnutrição e é uma das principais fontes de proteína animal em países em desenvolvimento. O pescado não é apenas uma fonte de proteínas e gorduras saudáveis de cadeia longa do tipo ômega-3, mas também uma fonte essencial de outros nutrientes, como iodo, vitamina D e cálcio, que são cruciais para uma vida saudável (FAO, 2015a). Uma porção de 150 g de peixe pode fornecer cerca de 50-60% das necessidades diárias de proteína de um adulto (FAO, 2014). Atualmente, um número cada vez maior de pessoas tem preferência pelo peixe como uma alternativa saudável à carne (FAO, 1997a). A captura/produção deste tipo de alimento, assim como o seu consumo, tem aumentado nos últimos anos.

O setor das pescas tem apresentado a nível mundial uma evolução considerável, com destaque para a produção em aquacultura. A produção de pescado tem crescido constantemente nas últimas cinco décadas (Figura 1), com a produção de peixe a aumentar a uma taxa média anual de 3,2% (FAO, 2014).

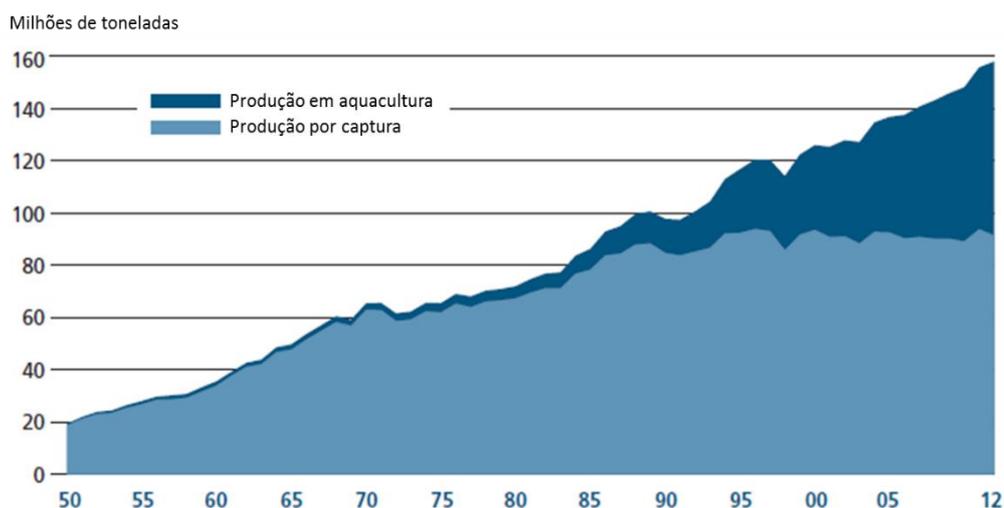


Figura 1 – Pesca por captura e produção em aquacultura no mundo (FAO, 2014).

O consumo mundial anual de peixe por indivíduo aumentou de um valor médio de 9,9 kg em 1960 para 19,2 kg em 2012 (Tabela 2 e Figura 2) (FAO, 2014). Este relevante desenvolvimento tem sido impulsionado pelo crescimento populacional e facilitado pela expansão da produção de peixe em aquacultura e por canais de distribuição mais eficientes (FAO, 2010).

Tabela 2 – Quantidades mundiais para capturas, produção em aquacultura e utilização dos produtos de pesca (FAO, 2014).

	2007	2008	2009	2010	2011	2012
(Milhões de toneladas)						
Produção						
Captura						
Interior	10,1	10,3	10,5	11,3	11,1	11,6
Marinha	80,7	79,9	79,6	77,8	82,6	79,7
Total de capturas	90,8	90,1	90,1	89,1	93,7	91,3
Aquacultura						
Interior	29,9	32,4	34,3	36,8	38,7	41,9
Marinha	20,0	20,5	21,4	22,3	23,3	24,7
Total de aquacultura	49,9	52,9	55,7	59,0	62,0	66,6
Total de pesca no mundo	140,7	143,1	145,8	148,1	155,7	158,0
Utilização						
Consumo humano	117,3	120,9	123,7	128,2	131,2	136,2
Fins não alimentares	23,4	22,2	22,1	19,9	24,5	21,7
População (bilhões)	6,7	6,8	6,8	6,9	7,0	7,1
Consumo mundial de peixe, por indivíduo (kg)	17,6	17,9	18,1	18,5	18,7	19,2

A produção em aquacultura tem vindo a crescer, não só devido à maior procura de produtos de pesca e seus derivados que promove a consequente necessidade de se obterem produções em maiores quantidades, mas também devido às alterações que têm ocorrido nos ecossistemas, nomeadamente a contaminação dos recursos marinhos, a variação dos caudais e dos percursos dos cursos de água e a regulamentação da atividade piscatória.

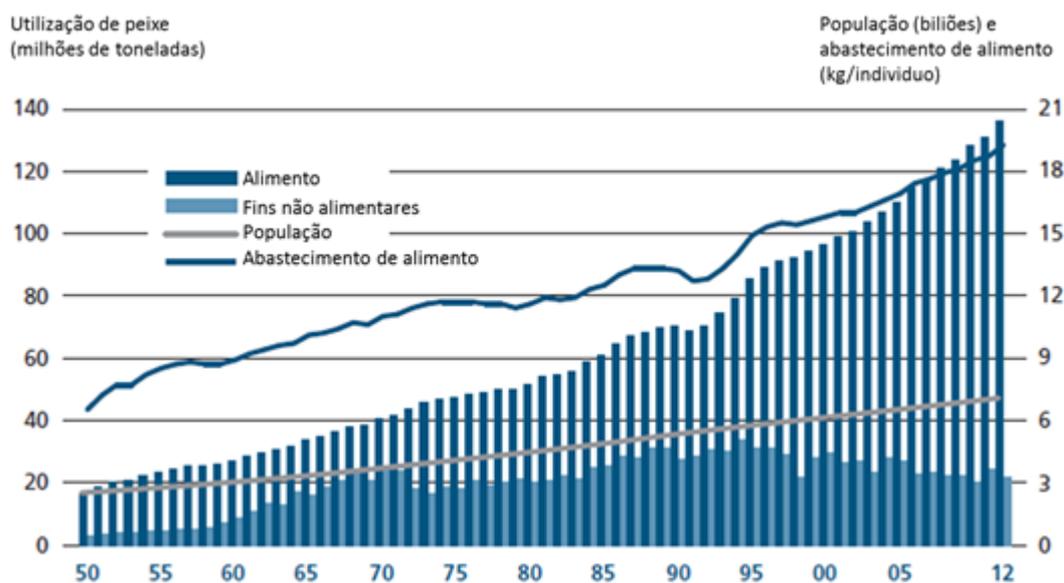


Figura 2 – Produção e utilização de peixe no mundo (FAO, 2014).

Em 2010, o peixe representou 16,7% do consumo de proteína animal e 6,5% de toda a proteína consumida pela população mundial. O consumo de peixe tem crescido de forma constante, ultrapassando o crescimento da população mundial (1,6%) e aumentando o consumo médio deste alimento por indivíduo.

Existem diferenças marcantes entre países em termos de quantidade e variedade de peixe consumido por indivíduo. As diferenças no consumo dependem da disponibilidade e custo do peixe e da existência de alimentos alternativos, e ainda de fatores socioeconômicos e culturais. O consumo anual de peixe por indivíduo pode variar de menos de 1 kg até mais de 100 kg (Figura 3), sendo o consumo geralmente mais elevado nas áreas costeiras (FAO, 2014).

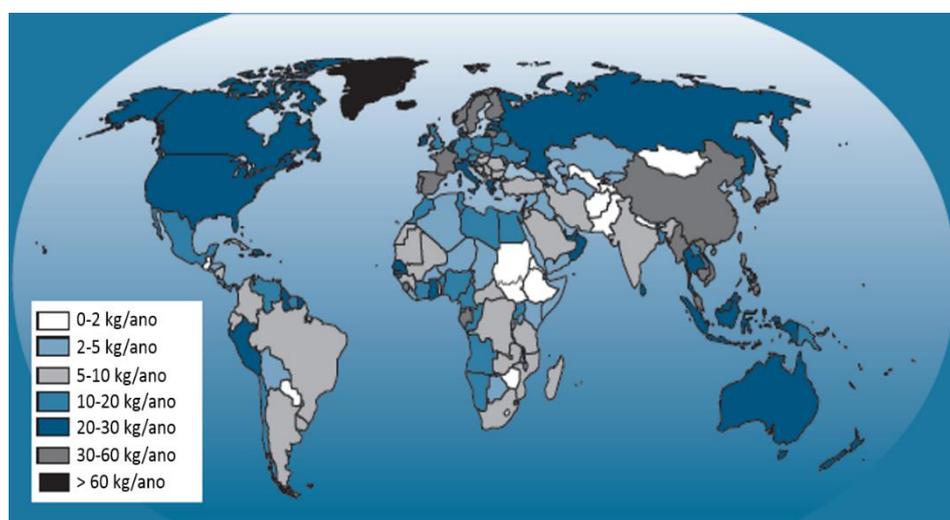


Figura 3 – Consumo médio de peixe por indivíduo entre 2008-2010 (FAO, 2014).

O peixe é um alimento “heterogêneo” devido à existência de muitas espécies, ambientes onde é criado e proveniência (aquacultura ou pesca). Inovações e melhorias no processamento, transporte, distribuição, comercialização e respetivas tecnologias têm facilitado o comércio e o consumo de uma variedade de espécies e formas de produtos. Mudanças nas espécies consumidas são devidas ao crescimento da produção em aquacultura, impulsionando a procura de espécies que são principalmente produzidas em aquacultura, com uma diminuição dos seus preços e um forte aumento da sua comercialização, como por exemplo, camarão, salmão, bivalves, entre outros (FAO, 2014).

A localização geográfica de Portugal junto ao Oceano Atlântico contribui para que o consumo de peixe tenha um papel importante na alimentação da população (ASAE, 2012).

1.3.1. Composição do peixe

O peixe e os produtos de pesca contêm água, proteínas e outros compostos nitrogenados, lípidos, hidratos de carbono, minerais e vitaminas. No entanto, a composição química do peixe varia consoante a espécie e de peixe para peixe, dependendo da idade, sexo, ambiente em que se encontra e estação do ano em que ocorre a captura (FAO, 2005).

O músculo do peixe pode classificar-se em músculo claro e músculo escuro (Figura 4). Peixes que contêm uma maior fração de músculo claro são designados de peixes magros (menor teor de gordura) e peixes que contêm uma maior fração de músculo escuro são designados de peixes gordos (maior teor de gordura). Em peixes magros, como por exemplo o bacalhau, há uma pequena faixa de músculo escuro sob a pele em ambos os lados do corpo, mas predomina o músculo claro. Em peixes gordos como o arenque e a cavala as tiras de músculo escuro são muito maiores em proporção e contêm altas concentrações de gordura e de certas vitaminas (Murray e Burt, 2001).

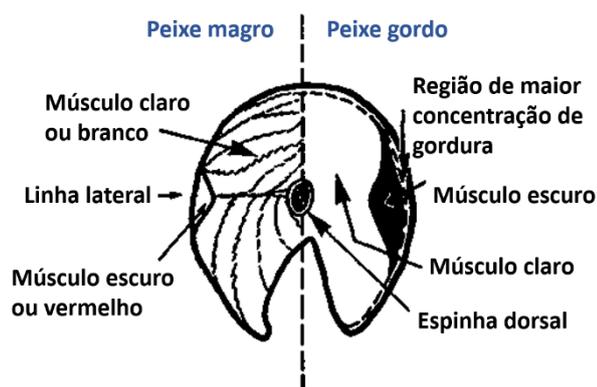


Figura 4 – Músculo claro e escuro no peixe (Murray e Burt, 2001).

Componentes do músculo de peixe

- **Água** – O principal constituinte do músculo de peixe é a água, que normalmente representa cerca de 80% do peso de um filete de peixe branco fresco, enquanto o teor médio de água do músculo de peixe gordo é de cerca de 70%. Certas espécies às vezes podem ser encontradas com um teor de água entre os extremos de 30 e 90% (Murray e Burt, 2001).

- **Proteínas** – A quantidade de proteínas presente no músculo de peixe tem valores entre 15 e 20%, podendo, contudo, algumas espécies ter valores na ordem dos 28%. As proteínas de peixe contêm todos os aminoácidos essenciais e fornecem uma boa combinação destes nas devidas proporções, adequadas às necessidades nutricionais do Homem,

comparando-se favoravelmente com a carne, leite e ovos (Murray e Burt, 2001). As proteínas de peixe são fonte de lisina, metionina e cisteína, aminoácidos encontrados em concentrações elevadas nestas proteínas, ao contrário das presentes por exemplo, nos cereais, que são pobres nestes aminoácidos essenciais (FAO, 2005).

- **Lípidos** – Dependendo do seu teor de lípidos, que pode variar entre 0,2% e 25%, os peixes são classificados como magros, semi-gordos ou gordos. Peixes que vivem no fundo, como o bacalhau, escamudo e pescada são consideradas espécies magras. Peixes gordos incluem espécies como o arenque e a cavala. Algumas espécies armazenam lípidos em partes limitadas dos seus tecidos do corpo ou em quantidades menores do que as espécies típicas gordas, e são denominadas semi-gordas (por exemplo, barracuda, tainha e tubarão) (FAO, 2005). À medida que o teor de gordura aumenta, o teor de água diminui, e vice-versa. A gordura nem sempre está uniformemente distribuída por todo o corpo de um peixe, encontrando-se por vezes maioritariamente armazenada no fígado (Murray e Burt, 2001).

- **Hidratos de carbono** – Os hidratos de carbono são considerados uma componente minoritária, uma vez que a quantidade presente no peixe é pequena. Em peixe branco a quantidade é geralmente inferior a 1%, mas no músculo escuro de algumas espécies gordas pode ocasionalmente atingir os 2%. Alguns moluscos podem conter até 5% de hidrato de carbono glicogénio (Murray e Burt, 2001).

- **Minerais e vitaminas** – O conteúdo de vitaminas é comparável à dos mamíferos, exceto para as vitaminas A e D, que são encontradas em grandes quantidades no músculo de espécies gordas e especialmente no fígado de espécies como o bacalhau e o linguado. Quanto aos minerais, o músculo de peixe é uma fonte importante de cálcio e fósforo, bem como de ferro, cobre e selénio. Peixes de água salgada contêm elevados níveis de iodo (FAO, 2005). Minerais e vitaminas incluem uma gama de substâncias muito diferentes, que devem estar presentes na dieta, mesmo que apenas em quantidades mínimas, não só para promover a boa saúde, mas também para manter a própria vida. Embora seja improvável que esta seja a única fonte de um mineral essencial na dieta, o peixe não fornece um conteúdo equilibrado de minerais numa forma facilmente utilizável (Murray e Burt, 2001). As vitaminas podem ser divididas em dois grupos, as que são solúveis em gordura (lipossolúveis), tais como vitaminas A, D, E e K, e as que são solúveis em água (hidrossolúveis), tais como as vitaminas B e C. Todas as vitaminas necessárias, para promover a boa saúde nos seres humanos, estão presentes nos peixes, mas as quantidades variam de espécie para espécie e ao longo do ano.

Muitas vezes as partes de um peixe normalmente não ingeridas, tais como o fígado e o intestino, contêm quantidades maiores de vitaminas lipossolúveis do que o músculo. O fígado de bacalhau, por exemplo, contém quase toda a vitamina A e D presente na espécie. Em contraste, as mesmas duas vitaminas em enguias estão presentes principalmente no músculo. As vitaminas hidrossolúveis, embora presentes na pele, no fígado e no intestino, estão muitas vezes distribuídas uniformemente, mas em algumas espécies o músculo pode conter mais de metade da quantidade total de vitaminas presente no peixe. As ovas, quando presentes, são também uma boa fonte destas vitaminas (Murray e Burt, 2001).

- **Azoto não proteico** – Os peixes têm uma fração de azoto não proteico constituída por compostos solúveis em água, de baixo peso molecular. Esta fração de azoto não proteico constitui entre 9 a 18% do azoto total, incluindo o óxido de trimetilamina, aminoácidos livres, creatina e carnosina. Apesar dos seus baixos níveis, os constituintes desta fração desempenham um papel importante na qualidade do pescado (FAO, 2005).

1.3.2. Importância do peixe na alimentação

Existem inúmeros benefícios nutricionais atribuídos ao consumo de produtos da pesca. Estes produtos são ricos em proteínas, são fáceis de digerir e apresentam um baixo teor de colesterol. O conteúdo lipídico dos peixes apresenta, normalmente, uma percentagem reduzida de ácidos gordos saturados e um elevado nível de polinsaturados dos quais se evidenciam os do tipo ómega-3 de cadeia longa, os quais podem representar até 40% do total destes ácidos gordos. O peixe é a única fonte de quantidades substanciais deste tipo de ácidos gordos, estando este tipo de compostos fortemente ligados à redução do risco de muitas doenças (Mozaffarian e Rimm, 2006; Ruxton et al., 2004).

Os ácidos gordos ómega-3 são considerados essenciais em virtude de não poderem ser sintetizados pelo organismo humano e serem indispensáveis para o normal funcionamento e crescimento de todos os seus tecidos. Diversos estudos têm mostrado que os ácidos docosahexaenóico (DHA) e eicosapentaenóico (EPA) têm um papel importante na diminuição do risco de doença cardiovascular e acidente vascular cerebral (Cundiff et al., 2007), ação anti-inflamatória (Pilon et al., 2011), redução dos níveis dos triglicéridos e do colesterol total (Mozaffarian e Wu, 2011) e prevenção da doença cardíaca coronária e trombose (Kris-Etherton et al., 2002). O consumo de ácido docosahexaenóico e eicosapentaenóico parece ainda ter efeitos benéficos na reprodução, no sistema imunológico,

na prevenção ou tratamento de determinados tipos de cancro, bem como no desenvolvimento pré-natal (Connor, 2000). Por serem componentes estruturais das membranas fosfolipídicas, os ácidos gordos ómega-3 revelam-se importantes para o desenvolvimento do cérebro, sistema nervoso e retina pelo que o seu consumo está associado a uma melhoria do desenvolvimento cognitivo e da função neurológica em fetos (Cohen et al., 2005; McCann e Ames, 2005), bem como a uma melhoria da saúde ocular (SanGiovanni et al., 2007; Seddon et al., 2006).

Ataques cardíacos e derrames são as duas causas mais comuns de morte prematura no mundo (WHO, 2014) e o consumo deste tipo de alimento demonstrou que pessoas que consomem peixe regularmente aparentam ter um menor risco de ataques cardíacos, derrames e morte por doença cardíaca (Buscemi et al., 2014; Chowdhury et al., 2012; Djoussé et al., 2012; Virtanen et al., 2008).

Há evidências preliminares de que consumir peixe gordo regularmente pode levar a uma melhoria do sono (Gominak e Stumpf, 2012; Hansen et al., 2014), diminuição do desenvolvimento de degeneração macular (doença que leva à perda de visão) relacionada com a idade (Augood et al., 2008; Christen et al., 2011; Lim et al., 2012) e a um risco inferior de asma (Li et al., 2013; Yang et al., 2013).

Diversos estudos demonstraram que o consumo de ácidos gordos do tipo ómega-3 ou de óleo de peixe está ligado à redução do risco de diabetes tipo 1 em crianças, assim como a uma forma de diabetes autoimunes em adultos (Löfvenborg et al., 2014; Stene e Joner, 2003). Os resultados são preliminares, mas os investigadores acreditam que a causa desta redução seja devida ao consumo de ómega-3 e vitamina D. Alguns trabalhos indicam que o consumo de peixe pode reduzir o risco de artrite reumatoide e esclerose múltipla, mas ainda não há evidências que o comprovem (Bäärnhielm et al., 2014; Di Giuseppe et al., 2014).

Uma das consequências do envelhecimento é o deterioramento da função do cérebro (referido como o declínio cognitivo relacionado com a idade). Isto é normal em muitos casos, mas há também graves doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer. Estudos têm mostrado que pessoas que comem mais peixe têm taxas mais lentas de declínio cognitivo (Morris et al., 2005). Outros estudos evidenciaram que pessoas que comem peixe todas as semanas têm mais matéria cinzenta nos centros do cérebro que regulam a memória e emoção (Raji et al., 2014).

Pessoas que comem peixe regularmente são menos propensas a tornar-se deprimidas (Grosso et al., 2014). Ácidos gordos do tipo ómega-3 são benéficos contra a depressão, e aumentam a eficácia de medicamentos antidepressivos (Hallahan et al., 2007; Lin e Su, 2007; Peet e Horrobin, 2002).

Os peixes e os seus derivados são boas fontes alimentares de vitamina D. Peixes gordos como o salmão e o arenque contêm elevadas quantidades desta vitamina (Malesa-Ciećwierz e Usydus, 2015), que apresenta diversas funções no nosso organismo, nomeadamente no desenvolvimento e manutenção de vários sistemas/órgãos, dos quais são exemplo os olhos, os pulmões, a pele e os ossos. A vitamina A, também presente no peixe, é considerada um poderoso antioxidante, pelo que se presume possuir alguma ação na prevenção das doenças cardíacas, bem como na redução de certos tipos de cancro. A vitamina E, outra das vitaminas lipossolúveis também com elevada capacidade antioxidante e atividade anti-inflamatória, pode igualmente ser encontrada em quantidades consideráveis em determinadas espécies de peixe. Quanto às vitaminas hidrossolúveis, os peixes constituem boas fontes de vitaminas do complexo B, nomeadamente da tiamina (B1), riboflavina (B2), piridoxina (B6) e cobalamina (B12) que são essenciais para o metabolismo celular. O peixe é um alimento que traz inúmeros benefícios para a saúde, no entanto, quando contaminado poderá ter um papel inverso, apresentando riscos para a saúde humana (ASAE, 2012; Australian Government, 2004; FAO, 1997b; Fernandes et al., 2012; Murray e Burt, 2001; Norwegian Scientific Committe for Food Safety (VKM), 2014).

1.3.3. Metais e outros elementos em peixe (essencialidade vs toxicidade)

Os seres humanos necessitam de uma ingestão adequada de alguns elementos essenciais, tais como sódio, cálcio, potássio, magnésio, manganês, selénio, cromo (III), cobre, cobalto, ferro e zinco (FAO, 1997b; Ikem e Egiebor, 2005).

O ferro é um nutriente mineral que é essencial para a formação da hemoglobina e de determinadas enzimas no corpo e também está envolvido na formação da mioglobina, usada para transporte de oxigénio nas células musculares. O corpo pode armazenar algum ferro nos tecidos e também pode reciclar parte do ferro quando os glóbulos vermelhos do sangue morrem. No entanto, um fornecimento contínuo de ferro deve ser ingerido com a dieta para manter uma boa saúde. O cálcio e o magnésio são componentes importantes dos ossos e também devem ser ingeridos em quantidades adequadas. Um problema relacionado com a

falta de cálcio na dieta é, por exemplo, a osteoporose (perda óssea). O manganês possui funções estruturais e enzimáticas enquanto o zinco tem um papel fundamental no sistema imunológico e também como catalisador de reações enzimáticas. Apesar de estes elementos serem necessários em menor quantidade que os macronutrientes, não deixam de ser fundamentais para um bom funcionamento do corpo humano (FAO, 1997b).

Os seres humanos podem ser expostos a elementos não essenciais, e mesmo prejudiciais, como é o caso do arsénio, chumbo, mercúrio, cádmio, níquel, entre outros, através do consumo de água potável, do consumo de alimentos frescos e processados e através da exposição ocupacional. Alguns dos contaminantes químicos, tais como os metais, são tóxicos e persistentes. A principal fonte de exposição dos seres humanos a metais é através da ingestão de alimentos (FAO, 1997b; Ikem e Egiebor, 2005). Nesse sentido, têm sido efetuados estudos a fim de quantificar o nível desses contaminantes em alimentos para avaliar o seu risco.

O mercúrio pode induzir alterações no normal desenvolvimento do cérebro das crianças e em níveis mais elevados pode induzir alterações neurológicas nos adultos. Apresenta efeitos de toxicidade renal e é um possível carcinogéneo humano. A exposição crónica a arsénio pode levar a dermatites, pigmentação da pele, formação de verrugas e cancro de pulmão. A ingestão excessiva de estanho pode causar irritações gastrointestinais, diarreia, vômitos, náuseas, anemia, problemas de fígado e rins, e irritação cutânea e ocular. O cádmio pode acumular-se no organismo, induzir disfunção renal, doenças ósseas, hipertensão, tremor, deficiências hepáticas, alterações na função reprodutora e é um possível carcinogéneo. O chumbo induz a redução do desenvolvimento cognitivo e do desempenho intelectual das crianças, aumenta a pressão arterial e potencia a doença cardiovascular em adultos, estando associado a um crescimento lento, hiperatividade, comportamentos antissociais e aprendizagem e audição debilitadas. O níquel pode causar problemas respiratórios e é cancerígeno. O cromo (VI) é considerado carcinogéneo. O cobalto em níveis elevados pode ter efeitos cardíacos adversos. O cobre quando ingerido em quantidades elevadas pode causar danos no fígado e nos rins (Ikem e Egiebor, 2005; Iwegbue, 2015).

Os peixes e todas as outras formas de vida aquáticas estão constantemente expostos aos produtos químicos existentes em águas contaminadas tornando-se bons indicadores de contaminação por metais em sistemas aquáticos. Espécies predadoras podem apresentar maior teor de contaminação como resultado de bioamplificação, enquanto peixes de

diferentes idades apresentam diferentes teores de contaminação como resultado de bioacumulação. A presença de elementos potencialmente tóxicos em peixes é dependente da localização geográfica, da espécie e do tamanho do peixe, dos padrões de alimentação, da solubilidade dos produtos químicos e da sua persistência no ambiente (FAO, 2015b). A acumulação de um metal pode atingir níveis perigosos em função do tipo e frequência do consumo de peixe, sendo uma ameaça para a saúde humana devido às suas características de toxicidade cumulativas nos organismos vivos. A exposição contínua a baixas doses de contaminantes pode estar relacionada com o surgimento de várias doenças crônicas (Agah et al., 2007).

Existem estudos que demonstram, através da análise de vários tipos de alimentos, que o peixe e o marisco são os que apresentam valores mais elevados de metais, contribuindo para a ingestão destes elementos pelos seres humanos (Llobet et al., 2003). As fontes destes contaminantes para o meio aquático podem ser de origem antropogénica, nomeadamente esgotos domésticos, industriais e os provenientes de atividades agrícolas, ou de origem natural, tais como as provenientes dos processos de erosão dos solos e produtos expelidos nas erupções vulcânicas. Problemas associados à contaminação ambiental por metais surgiram pela primeira vez em países industrialmente avançados devido às descargas provenientes de indústrias. Pode referir-se o caso de exposição a compostos com toxicidade elevada, como foi o caso da exposição a mercúrio e cádmio no Japão e na Suécia: o aparecimento da doença de Minamata no Japão causou a morte de muitas pessoas devido à ingestão de peixe contaminado com níveis elevados de mercúrio e os efeitos devastadores provocados pela ingestão de animais contaminados com cádmio, que deu origem ao aparecimento da doença de Itai-Itai em seres humanos (Rahimi et al., 2012).

Dada a problemática da presença deste tipo de contaminantes nos produtos da pesca e a relevância do consumo destes produtos para a saúde humana, a quantificação dos elementos essenciais e potencialmente tóxicos torna-se importante para poder balancear os riscos e benefícios associados ao seu consumo.

Os métodos analíticos atuais apresentam a sensibilidade necessária para a deteção e quantificação destes elementos, no entanto, antes da análise é por vezes necessário fazer um pré-tratamento da amostra, uma vez que os contaminantes estão presentes nos alimentos em baixas concentrações e a matriz é complexa, podendo introduzir perturbações nessa quantificação (Careri et al., 2002).

1.3.4. Quantificação de elementos essenciais e potencialmente tóxicos em peixe

Várias técnicas analíticas, tais como a espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) (Medeiros et al., 2012), espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (Tuzen, 2009), espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite (GF-AAS) (Fallah et al., 2011) e espectrometria de absorção atômica de chama (F-AAS) (Ghanemi et al., 2011) têm sido utilizadas para a determinação de elementos essenciais e potencialmente tóxicos em amostras de peixe. As técnicas baseadas em ICP-OES e ICP-MS têm sido amplamente utilizadas para a determinação dos oligoelementos e contaminantes devido à sua capacidade multi-elementar, grande gama linear de trabalho e limites de quantificação adequados (Antes et al., 2010; Dressler et al., 2011).

A preparação das amostras tem também recebido atenção, uma vez que este passo pode representar uma fonte de erros na quantificação analítica. A digestão com ácidos oxidantes é o método de preparação de amostra de peixe mais comum. Vários métodos de digestão de peixe para posterior análise de elementos essenciais e potencialmente tóxicos têm sido descritos na literatura, contudo, o procedimento mais utilizado na preparação da amostra para posterior análise envolve os seguintes passos: recolha da amostra de peixe, lavagem para remover lamas, armazenamento em gelo até à chegada ao laboratório; no laboratório, corte, com uma faca de aço inoxidável ou de cerâmica, da porção ou o tecido de peixe que se pretende analisar (por exemplo, músculo, fígado, rins, pele, brânquias, etc.); liofilização e homogeneização com recurso a um almofariz da porção retirada; pesagem de uma porção representativa da amostra diretamente num frasco de teflon, adição dos reagentes e posterior digestão numa placa de aquecimento ou num sistema assistido por micro-ondas; transferência do digerido para um frasco e aferição do volume com água ultrapura. Os reagentes utilizados durante o processo devem ser de elevada pureza e o material utilizado no processo de digestão tem de ser previamente lavado com HNO_3 (geralmente a 50%, durante 24 horas) e depois com água ultrapura.

Como exemplo, refere-se o trabalho de Ikem & Egiebor (2005) que determinaram a concentração de Ag, As, Cd, Cr, Fe, Pb, Mn, Ni, Co, Cu, Sn, V e Zn em peixe enlatado por ICP-OES e de Hg por absorção atômica, após decomposição térmica da amostra; neste trabalho o músculo de peixe (peso húmido) foi digerido com HNO_3 concentrado em sistema de micro-ondas, sendo depois adicionado H_2O_2 e repetido o aquecimento em micro-ondas;

os extratos foram diluídos com água desionizada e analisados por ICP-OES. Noutro trabalho, Gu et al. (2015) determinaram o conteúdo de Cd, Pb, Cr, Ni, Cu, Zn, Fe e Mn em peixe, por AAS, após adição de HNO₃ concentrado e H₂O₂ e digestão num sistema de micro-ondas; os extratos foram depois aquecidos até restar 1 mL de solução e diluídos com água ultrapura. Outros exemplos são apresentados na Tabela 1 (ver matriz alimentícia peixe).

Paralelamente a este tipo de análises é geralmente efetuada a análise de materiais de referência certificados, brancos, padrões, réplicas e por vezes também se usam outros métodos de análise para avaliar a fiabilidade dos resultados obtidos. O controlo de qualidade e a validação do método são etapas importantes quando se efetuam análises deste tipo, a fim de garantir que os resultados obtidos na análise são fiáveis e apresentam a qualidade exigida. Após a análise é importante comparar os resultados obtidos com os permitidos pela legislação a fim de verificar se existe risco associado; isto no caso dos contaminantes. Por outro lado, o conhecimento da concentração dos elementos essenciais, existentes no peixe, permite estimar a contribuição (%) que esse alimento tem para a ingestão da dose diária recomendada (DDR) de determinado oligoelemento.

1.3.5. Legislação sobre teores máximos de alguns elementos em peixe

Alguns elementos podem ser essenciais ou potencialmente tóxicos dependendo das concentrações em se encontram nos alimentos (Hague et al., 2008). Uma avaliação da concentração desses elementos nos alimentos e uma comparação desses valores com a legislação é fundamental para manter em segurança a saúde dos consumidores.

A fim de proteger a saúde pública, é essencial manter os contaminantes a níveis que sejam aceitáveis do ponto de vista toxicológico e assegurar que os produtos que contenham contaminantes que excedam os teores máximos não sejam colocados no mercado como tal, nem após mistura com outros géneros alimentícios, nem utilizados como ingredientes noutros alimentos (CE, 2006).

No Regulamento (CE) N° 1881/2006 da comissão de 19 de dezembro de 2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios são fixados os teores máximos de alguns contaminantes, sendo que os valores dos metais estão tabelados na secção 3 do referido documento. Esses teores máximos são expressos em mg/kg de peso fresco e são diferentes consoante o género alimentício em questão. Apenas estão tabelados valores para os metais chumbo, cádmio, mercúrio e estanho inorgânico, no entanto, para o

género alimentício peixe não são fixados valores máximos para o estanho na forma inorgânica (CE, 2006). Estes valores máximos variam ainda consoante a espécie de peixe. Mais recentemente este regulamento sofreu várias alterações, na sequência de novos regulamentos tais como: Regulamento (CE) N° 629/2008 da comissão de 2 de Julho de 2008 que altera o Regulamento (CE) N° 1881/2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios (CE, 2008); Regulamento (UE) N° 420/2011 da comissão de 29 de abril de 2011 que altera o Regulamento (CE) N° 1881/2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios (CE, 2011a); Regulamento (UE) N° 488/2014 da comissão de 12 de maio de 2014 que altera o Regulamento (CE) N° 1881/2006 no que diz respeito aos teores máximos de cádmio nos géneros alimentícios (CE, 2014); Regulamento (UE) 2015/1005 da comissão de 25 de junho de 2015 que altera o Regulamento (CE) N° 1881/2006 no que diz respeito aos teores máximos de chumbo em certos géneros alimentícios (CE, 2015a) e pelo Regulamento (UE) 2015/1006 da comissão de 25 de junho de 2015 que altera o Regulamento (CE) N° 1881/2006 no que diz respeito aos teores máximos de arsénio na forma inorgânica nos géneros alimentícios. Neste último regulamento foi adicionado um metal à lista, o arsénio, no entanto não foram fixados valores máximos deste elemento em peixe (CE, 2015b).

Reunindo a informação dos regulamentos referidos constata-se que para a parte comestível do peixe existem valores máximos permitidos para os elementos chumbo, cádmio e mercúrio. Estes valores são apresentados na Tabela 3 (coluna 3), assim como a referência ao regulamento que lhe deu origem. A existência de vários valores de legislação para um determinado elemento prende-se com o facto de existirem diferentes valores tabelados consoante a espécie de peixe. Para informação mais detalhada acerca dos valores máximos para uma determinada espécie de peixe devem ser consultadas as tabelas existentes nos anexos desses regulamentos (secção 3). Ainda, para um mesmo elemento (como é o caso do mercúrio) pode ser necessária a consulta de regulamentos diferentes, consoante a espécie de peixe, uma vez que as alterações efetuadas no regulamento “original” (Regulamento (CE) N° 1881/2006) dizem respeito a apenas algumas partes desse documento e não ao documento como um todo. Assim, os vários documentos devem ter sido em conta pois cada documento tem informação mais atualizada de determinada secção.

Uma vez que só estão tabelados limites máximos para três elementos tóxicos na parte comestível do peixe foi efetuada pesquisa sobre valores permitidos noutros países. Assim,

na Tabela 3, é apresentada a concentração máxima de contaminante admissível por kg de peixe, na legislação europeia e noutros países.

Para os elementos essenciais foi apresentado o valor de referência diário (coluna 1, Tabela 3) e valores máximos de ingestão diária tolerável, que não deve ser ultrapassada (coluna 2, Tabela 3).

Tabela 3 – Valores de referência dietéticos diários, máximos diários toleráveis para alguns elementos e valores máximos permitidos pela legislação na parte comestível do peixe.

Elemento	Valores de referência dietéticos diários (adultos)	Máximos diários toleráveis (Supplement Quality, 2004)	Concentração máxima de alguns elementos admissível na parte comestível do peixe (mg/kg)				
			Europa	Austrália (FAO, 1983)	Canadá (FAO, 1983)	Brasil (ANVISA, 2013)	Chile (FAO, 1983)
B		20 mg					
Mg	300-350 mg (EFSA, 2015a)						
Ca	950-1000 mg (EFSA, 2015b)						
V		1,8 mg					
Cr	nenhum valor fixado (EFSA, 2014a)						
Mn	3 mg (EFSA, 2013a)						
Fe	11-16 mg (EFSA, 2010)						
Ni		1,0 mg					
Cu	1,3-1,6 mg (EFSA, 2015c)			10/30			10
Zn	7,5-16,3 mg (EFSA, 2014b)			40/150/ 1000/1500			100
As				1,0/1,5	3,5	1	1
Se	70 µg (EFSA, 2014c)			1,0/2,0			0,30
Mo	65 µg (EFSA, 2013b)						
Pb			0,30 (CE, 2015a)	1,5/2,0	0,5	0,30	2,0
Cd			0,050/0,10/ 0,15/0,25 (CE, 2014)	0,2/5,5		0,05/0,10/ 0,20/0,30	0,05
Sn				40/50/ 150/250			
Sb				1,5			
Hg			0,30 (CE, 2011a) 1,0 (CE, 2008)	0,5/1	0,5	0,50/1,0	

Como se pode verificar os valores máximos de contaminantes permitidos pela legislação, no músculo de peixe (parte comestível), são diferentes de país para país. Esta diferença pode

dever-se à diferente quantidade de consumo deste alimento por parte da população o que origina um risco (exposição à contaminação) também diferente.

Na legislação europeia tem-se observado, nos últimos anos, um aumento da lista de alimentos a avaliar e uma retificação dos valores máximos permitidos, no entanto, esta lista ainda possui uma dimensão reduzida no que diz respeito aos contaminantes metálicos em peixe. É de esperar que futuramente sejam tabelados valores máximos para o arsénio e estanho na forma inorgânica em peixe, uma vez que já existe legislação relativa a estes elementos noutros géneros alimentícios. Ainda é de esperar que num futuro mais longínquo possam ser também tabelados valores máximos para o níquel, uma vez que, nos próximos anos (2016, 2017 e 2018), segundo a Recomendação (UE) 2016/1111 da comissão de 6 de julho de 2016 sobre a monitorização do níquel nos alimentos, irá ser monitorizada a quantidade de níquel em alimentos, no entanto, o peixe ainda não faz parte dessa lista de alimentos a serem monitorizados (CE, 2016a).

1.3.6. Legislação relativa a métodos de análise e critérios de desempenho

Segundo o Regulamento (CE) N° 333/2007 da comissão de 28 de março de 2007 que estabelece métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de chumbo, cádmio, mercúrio, estanho na forma inorgânica, 3-MCPD e benzo(a)pireno nos géneros alimentícios existem muitos procedimentos específicos satisfatórios para a preparação das amostras que podem ser utilizados para efetuar o controlo dos contaminantes metálicos em peixe e consideram-se satisfatórios os que se encontram descritos na norma CEN Foodstuffs — Determination of trace elements — Performance criteria, general considerations and sample preparation (EN 13804:2013) sem prejuízo de outros poderem ser igualmente válidos (CE, 2007). Existem muitas outras normas publicadas, referentes a métodos de análise de alimentos (EURL, 2012), no entanto outros métodos poderão ser igualmente válidos.

Relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados é necessário garantir a qualidade e a comparabilidade dos resultados analíticos originados por laboratórios aprovados para o controlo oficial de metais. Para o efeito, devem usar-se sistemas de garantia da qualidade e, especificamente, aplicar métodos validados em conformidade com procedimentos e critérios de desempenho comuns e garantir a rastreabilidade relativamente a normas comuns ou acordadas em comum. Ainda é exigido que os laboratórios oficiais de controlo sejam acreditados em conformidade com a norma

ISO 17025 e os laboratórios autorizados terão de participar num programa externo internacionalmente reconhecido de avaliação e acreditação do controlo de qualidade. Além disso, os laboratórios autorizados devem provar a sua competência participando regularmente e com êxito em programas de comprovação de capacidade conhecidos ou organizados pelos laboratórios de referência nacionais ou comunitários (CE, 2002, 1996).

Em Portugal existe um Laboratório Nacional de Referência (LNR) aprovado para o controlo oficial de metais em peixes, o Instituto Português do Mar e da Atmosfera, como se pode verificar no site da European Union Reference Laboratory (EURL, 2016a). Estes laboratórios têm de participar em testes de comparação interlaboratoriais (EURL, 2016b). O European Union Reference Laboratory (EURL) suporta os LNR através da organização dessas comparações interlaboratoriais para a determinação de elementos químicos em alimentos de origem animal, como é o caso do peixe.

A legislação não é clara quanto à obrigatoriedade do cumprimento da legislação na análise de outros elementos em peixe, cingindo-se apenas aos contaminantes abordados no Regulamento (CE) N° 1881/2006.

No Regulamento (CE) N° 333/2007 da comissão de 28 de março de 2007 que estabelece métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de chumbo, cádmio, mercúrio, estanho na forma inorgânica, 3-MCPD e benzo(a)pireno nos géneros alimentícios é apresentada a legislação que estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores dos elementos/compostos mencionados (CE, 2007). Este regulamento foi posteriormente alterado pelo Regulamento (UE) N° 836/2011 da comissão de 19 de agosto de 2011 que altera o Regulamento (CE) N° 333/2007 que estabelece métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de chumbo, cádmio, mercúrio, estanho na forma inorgânica, 3-MCPD e benzo(a)pireno nos géneros alimentícios (CE, 2011b) e pelo Regulamento (UE) 2016/582 da comissão de 15 de abril de 2016 que altera o Regulamento (CE) N° 333/2007 no que diz respeito à análise do arsénio na forma inorgânica, chumbo e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e a certos critérios de desempenho da análise (CE, 2016b). Na parte C dos referidos regulamentos está apresentada a legislação referente à etapa de preparação das amostras e análise, assim como os critérios de desempenho da análise. Os métodos validados internamente devem respeitar os critérios de desempenho mencionados na Tabela 4.

Tabela 4 – Critérios de desempenho para métodos de análise de chumbo, cádmio e mercúrio em peixe.

Parâmetro	Critério		
Seletividade	Sem interferências matriciais ou espectrais		
Repetibilidade	$HORRAT_r$ menos de 2		
Reprodutibilidade	$HORRAT_R$ menos de 2		
Limite de deteção	= três décimos do LQ		
Limite de quantificação	Chumbo	Teor máximo no peixe enquadra-se no $\geq 0,1$ mg/kg	
		\leq um quinto do teor máximo	
	Cádmio e mercúrio	Teor máximo é $< 0,100$ mg/kg	Teor máximo é $\geq 0,100$ mg/kg
		\leq dois quintos do teor máximo	\leq um quinto do teor máximo

Uma vez que na legislação europeia (da qual Portugal é estado-membro) apenas são apresentados limites máximos para três contaminantes metálicos em peixe, também é apenas apresentada legislação no que diz respeito aos métodos de amostragem, análise e critérios de desempenho para estes três elementos. Esta abordagem poderá ser estendida a outros elementos; no entanto, os critérios de desempenho relativos aos limites de deteção e quantificação ficam restritos aos elementos presentes no Regulamento (CE) N° 1881/2006.

Como se pode observar na Tabela 4, a precisão do método é avaliada através do cálculo do valor de $HORRAT_r$ e $HORRAT_R$, que dizem respeito à razão entre o desvio padrão relativo (coeficiente de variação) calculado a partir dos resultados obtidos em condições de repetibilidade (r) ou reprodutibilidade (R) e o desvio padrão relativo estimado a partir da equação de Horwitz, na concentração de interesse. A repetibilidade (r) diz respeito a 66% da reprodutibilidade (R) (CE, 2007; Thompson, 2000).

As equações de Horwitz são equações de precisão generalizada independentes do analito e da matriz e apenas dependentes da concentração para a maioria dos métodos de análise de rotina. O desvio padrão relativo (DRP) estimado a partir da equação de Horwitz é obtido de acordo com o indicado na Tabela 5, tendo em conta a concentração da amostra (C).

Tabela 5 – Desvio padrão relativo estimado a partir da equação de Horwitz, na concentração de interesse.

$C < 1,2 \times 10^{-7}$	$DPR = 0,22\%$	Equação 1	Equação de Horwitz modificada
$1,2 \times 10^{-7} \leq C \leq 0,138$	$DPR = 2C^{-0,15}$	Equação 2	Equação de Horwitz

sendo que C é a taxa de concentração (ou seja, $1 = 100$ g/100 g; $0,001 = 1\ 000$ mg/kg).

Basicamente o valor de *HORRAT* é um critério de performance, em que se compara o coeficiente de variação obtido com o coeficiente de variação sugerido por Horwitz.

No que se refere aos métodos validados internamente, pode utilizar-se, como alternativa, uma abordagem “de adequação à finalidade” para se avaliar a adequabilidade desses métodos para o controlo oficial. Os métodos adequados para o controlo oficial têm de produzir resultados cuja incerteza-padrão combinada de medição (*u*) seja inferior à incerteza-padrão de medição máxima, calculada pela fórmula seguinte (CE, 2007):

$$Uf = \sqrt{(LD/2)^2 + (\alpha C)^2}$$

Equação 3

Onde:

Uf representa a incerteza-padrão de medição máxima ($\mu\text{g}/\text{kg}$).

LD representa o limite de deteção do método ($\mu\text{g}/\text{kg}$).

C corresponde à concentração em causa ($\mu\text{g}/\text{kg}$).

α é um fator numérico cuja utilização depende do valor de *C* (CE, 2007).

Estes critérios de desempenho, apresentados na legislação europeia, foram tidos em conta na realização deste trabalho, tendo-se estendido a presente legislação à determinação de outros elementos em peixe.

1.4. Objetivos do trabalho de Estágio

O presente trabalho enquadrou-se nos objetivos do Laboratório Central de Análises (LCA) da Universidade de Aveiro, no que diz respeito à receção de alunos para a realização de Estágio e apoio na sua formação na área de controlo e garantia da qualidade e validação de métodos analíticos. O trabalho desenvolvido no âmbito deste estágio também teve como objetivo proporcionar algum contacto com técnicas instrumentais de análise, nomeadamente ICP-MS e ICP-OES.

Foi identificada como sendo uma mais valia para futuros trabalhos de investigação e também para proporcionar resultados com uma qualidade superior aos clientes do LCA, a validação de metodologias para análise elementar em peixe utilizando técnicas com plasma indutivamente acoplado. A escolha deste tipo de matriz/alimento deveu-se a vários fatores, tais como a proximidade que Portugal tem ao mar, o crescente aumento do consumo que este

alimento tem vindo a alcançar, os benefícios que este alimento tem para a saúde humana, a crescente consciencialização da população com questões relacionadas com uma alimentação cuidada, variada e saudável, a necessidade de informação acerca desta temática que tem merecido poucos estudos em Portugal e o facto de o peixe ser um dos alimentos que mais contribui para a ingestão de elementos tóxicos.

Assim, o objetivo principal deste trabalho consistiu no desenvolvimento e validação de metodologias para análise de peixe, recorrendo a técnicas de análise multi-elementares existentes no LCA (ICP-OES e ICP-MS). A validação destes métodos teve como objetivo a sua posterior acreditação.

Os elementos para os quais as metodologias foram validadas foram: o manganês, o estrôncio, o cobre, o ferro e o zinco em peixe, ficando a acreditação condicionada por uma futura participação com êxito num ensaio de comparação interlaboratorial.

2. Materiais e métodos

2.1. Lavagem do material

Para a determinação de elementos vestigiais é importante que não ocorram contaminações, nem perdas de elementos que se queiram analisar por fenómenos de adsorção. Pó no ambiente do laboratório, impurezas nos reagentes e impurezas no material de laboratório, o qual está em contacto com a amostra, são potenciais fontes de contaminação. É importante que todo o material utilizado durante a execução do método esteja devidamente limpo.

No início do trabalho todo o material utilizado foi adequadamente lavado com uma solução de detergente Decon a 3% (v/v) e água da torneira. De seguida o material foi imerso numa mesma solução, durante 24 horas, e subsequentemente passado por água da torneira e por fim água ultrapura. Posteriormente foi colocado em ácido nítrico a 50% (v/v) durante pelo menos 24 horas. Após imersão no ácido o material foi passado por água ultrapura e deixado a secar com a abertura virada para baixo.

Os vasos de micro-ondas, de *teflon*, foram lavados inicialmente com uma solução de detergente Decon a 3% (v/v) e com água da torneira. Seguidamente os vasos de micro-ondas foram submetidos a um programa de aquecimento de micro-ondas, próprio para a lavagem dos mesmos, com uma solução de ácido nítrico a 50% (v/v). Por fim, os vasos foram lavados com água ultrapura pelo menos 5 a 6 vezes. A secagem dos vasos foi feita deixando-os a secar com a abertura virada para baixo. Nos casos em que o material foi utilizado imediatamente a seguir à lavagem procedeu-se à sua secagem com ar comprimido.

2.2. Equipamentos

O forno de micro-ondas utilizado para a digestão das amostras foi um CEM - MDS-81D, equipado com 12 vasos pressurizados.

O equipamento utilizado para a técnica de espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado foi um ICP-MS *Thermo X Series* (Thermo Scientific) equipado com uma bomba peristáltica, nebulizador Burgener e cones de níquel.

O equipamento utilizado para a técnica de espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado foi um ICP-OES *Jobin Yvon Activa M.* (configuração radial) equipado com uma bomba peristáltica e um nebulizador Burgener.

Os isótopos utilizados na quantificação por ICP-MS, dos elementos manganês e estrôncio foram os que possuíam 55 e 88 unidades de massa atômica, respectivamente.

Os comprimentos de onda utilizados para quantificar o cobre, o ferro e o zinco por ICP-OES foram 324,754; 259,940 e 213,857 nm, respectivamente.

2.3. Técnicas com plasma indutivamente acoplado utilizadas neste trabalho

A quantificação de elementos essenciais e de elementos potencialmente tóxicos em peixe pode ser efetuada por diversas técnicas instrumentais, tal como se pode verificar na Tabela 1. As técnicas de análise que usam plasma indutivamente acoplado como método de atomização, possuem vantagens relativamente às que têm atomização por chama ou eletrotérmica. Por este motivo, na realização deste trabalho as quantificações foram realizadas por ICP-OES e ICP-MS e estas técnicas são aqui sumariamente descritas.

2.3.1. Princípio de funcionamento do ICP-OES

O ICP-OES é uma técnica de emissão espectrofotométrica que se baseia na medição da radiação eletromagnética emitida pelo retorno de um eletrão de um estado de energia superior (excitado) para um estado de energia fundamental, sendo o comprimento de onda desta radiação característico para cada elemento. A energia é transferida para o átomo através de mecanismos de colisão com outra partícula resultando na excitação do mesmo. A energia é emitida na forma de luz com um determinado comprimento de onda, ou mais especificamente na forma de um fóton com determinada frequência (Cazes, 2005).

No plasma as amostras são transportadas em forma de aerossol e sofrem uma sequência de processos físico-químicos, tais como dessolvatação, vaporização, dissociação e atomização. A luz emitida no processo de passagem dos eletrões do estado excitado ao estado fundamental é filtrada e separada por região do espectro (difratada por redes de difração). Cada região do espectro está associada a uma transição eletrónica e as intensidades luminosas são medidas, sendo o seu valor proporcional à concentração do(s) elemento(s) em estudo (Skoog et al., 2013).

- **Constituintes do ICP-OES**

O ICP-OES é constituído pelos seguintes componentes: gerador de radiofrequências (RF), bobine de indução para formar o plasma, tocha, sistema de introdução da amostra

(inclui nebulizador e câmara de nebulização), colimador (lentes e espelhos), sistema de dispersão e um detetor. Na Figura 5 está representado o esquema de um equipamento de ICP-OES.

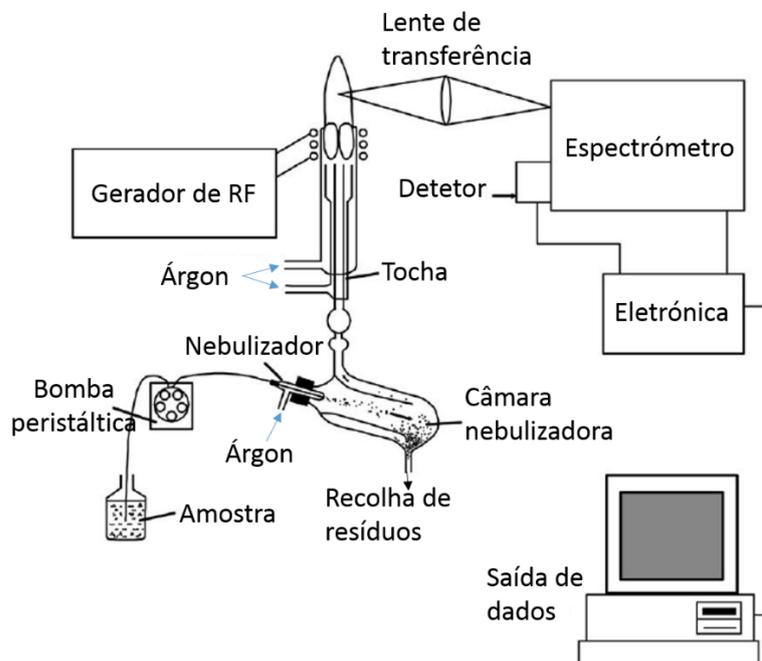


Figura 5 – Esquema de um equipamento de ICP-OES (Cazes, 2005).

A fonte de ICP é constituída pela bobina de indução e pela tocha, como pode ser observado na Figura 6. A tocha é constituída por três tubos de quartzo concêntricos através dos quais passa um fluxo de árgon. A ionização do árgon é iniciada por uma faísca de alta voltagem, que provoca a separação de alguns eletrões dos átomos de árgon. Esses eletrões são acelerados no interior do campo eletromagnético gerado, colidindo com átomos de árgon, o que origina a libertação de mais eletrões. Esta ionização, induzida por colisões do árgon, continua numa reação em cadeia que provoca a quebra dos átomos de árgon em iões e eletrões livres, formando o que é conhecido como uma descarga de plasma indutivamente acoplado. Essa descarga é sustentada, mantendo-se a passagem de árgon pela tocha e a passagem de corrente elétrica alternada pela bobina de indução. A temperatura de formação do plasma é suficientemente alta para requerer isolamento térmico. Este isolamento é realizado através do fluxo de árgon que suporta o plasma (Cazes, 2005; Thomas, 2001).

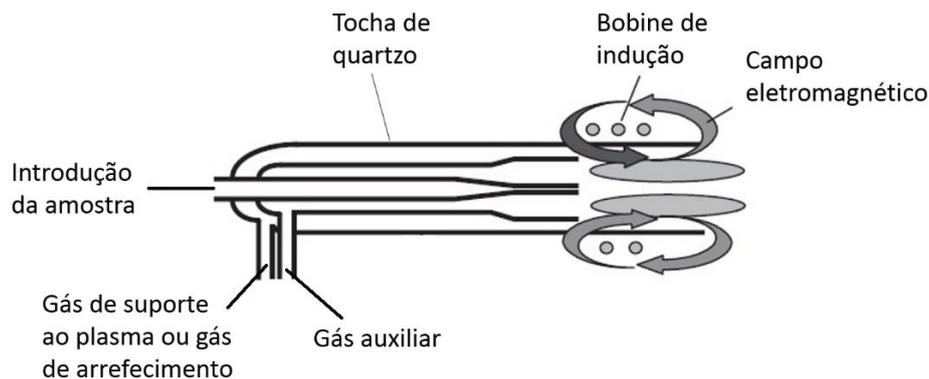


Figura 6 – Esquema de uma fonte de plasma acoplado indutivamente (Hill, 2007).

Para que as amostras cheguem ao plasma na forma de aerossol, uma vez que estas são líquidas, é necessária a utilização de um nebulizador, cuja função é converter uma amostra aquosa num aerossol com a ajuda de um gás de arraste (Hill, 2007; Skoog et al., 2013).

O gás usado, árgon, tal como todos os gases raros é monoatômico, quimicamente inerte e apresenta uma elevada energia de ionização (15,6 eV). Outras vantagens da utilização de árgon são: emissão de um espectro relativamente simples produzindo pouca interferência espectral na emissão; capacidade de atomizar, ionizar e excitar uma grande parte dos elementos da tabela periódica; baixo custo relativamente a outros gases raros já que este é mais abundante (1% da composição do ar) (Hill, 2007; Skoog et al., 2013).

O sistema ótico do equipamento de ICP-OES do LCA é do tipo Czerny-Turner e consiste basicamente num conjunto de espelhos colimadores, fendas e numa rede de difração. A luz que é emitida é dirigida para as redes de difração que contêm diversos sulcos. Cada sulco dispersa a luz incidente num ângulo largo, havendo uma relação direta entre o comprimento de onda e o ângulo de difração. Desta forma, os comprimentos de onda atômicos individuais são separados. O efeito é idêntico ao que se observa pelo arco-íris, onde cada comprimento de onda individual (cores) pode ser separado. O espectrómetro vai separar a radiação emissora em linhas espectrais, onde cada linha espectral é característica de um determinado elemento presente na amostra (Cazes, 2005; Skoog et al., 2013).

O detetor presente no equipamento do LCA é um dispositivo de carga acoplada (CCD), que é um detetor de estado sólido constituído por um arranjo de vários detetores individuais fotossensíveis (*pixels*) contidos num chip de silício. Estes detetores operam de forma muito similar a um filme fotográfico no sentido de que integram o sinal informativo quando a radiação os atinge. Medindo a intensidade das linhas espectrais selecionadas, o

espectrómetro dá informação quantitativa da concentração de cada elemento presente na amostra (Skoog *et al.*, 2013).

2.3.2. Princípio de funcionamento do ICP-MS

Em ICP-MS os iões são separados e os elementos quantificados de acordo com a sua razão massa/carga (m/z) sendo a concentração do elemento proporcional ao número de iões. A separação dos iões é proporcionada por um quadrupolo e a deteção por um multiplicador de eletrões com dínodos discretos. O fator de proporcionalidade entre resposta e concentração de analito diz respeito apenas a uma fração dos átomos de analito que são aspirados até ao detetor na forma de iões (Hill, 2007).

- **Constituintes do ICP-MS**

Na Figura 7 está representado o esquema de um equipamento de ICP-MS. À semelhança do ICP-OES, este equipamento possui um gerador de radiofrequências (RF), bobine de indução para formar o plasma, tocha, sistema de introdução de amostra (inclui também nebulizador e câmara de nebulização). No entanto difere nos componentes seguintes, porque também a mensuranda aqui é diferente. Estes componentes são nomeadamente a região de interface entre o ICP e o espectrómetro de massa, analisador e detetor (Cazes, 2005; Skoog *et al.*, 2013; Thomas, 2001).

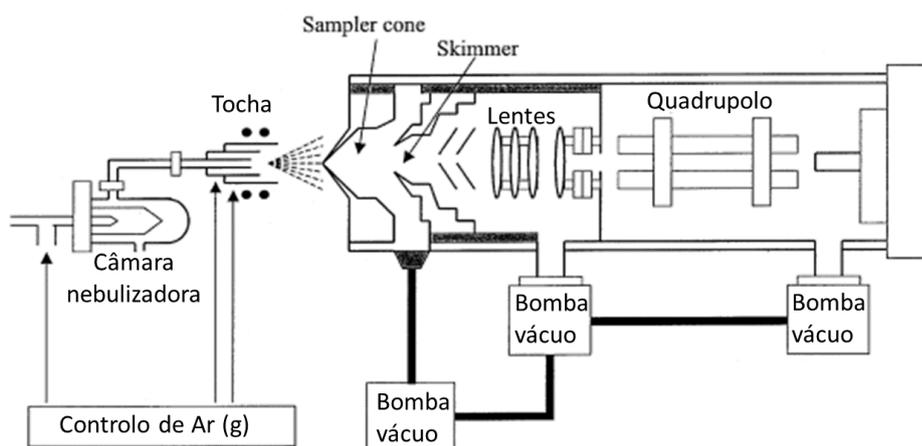


Figura 7 – Esquema de um equipamento de ICP-MS (Cazes, 2005).

A técnica de ICP-MS requer mais energia do que a utilizada para a atomização (ICP-OES) uma vez que também é necessário a ionização dos vários elementos que se pretendem

quantificar. Em ICP-MS, os íons formados são extraídos do plasma para o interior do espectrómetro de massa, atravessando um analisador que faz a separação destes, de acordo com as respectivas razões massa/carga. A zona entre o plasma e o analisador é designada por interface e tem como principal função assegurar que uma fração substancial dos íons produzidos no plasma seja transportada para o analisador de massas. A interface consiste em dois cones metálicos, denominados de *sampler* e *skimmer*. O plasma é orientado na direção do *sampler*, por onde uma fração do plasma pode passar. Uma lente extratora, posterior ao *skimmer*, possui um potencial elétrico negativo elevado, que atrai os cátions em direção ao analisador de íons. A pressão é sucessivamente reduzida ao longo da interface, atingindo praticamente o vácuo à entrada do analisador de íons (Cazes, 2005; Skoog et al., 2013; Thomas, 2001).

O papel do sistema de focagem de íons é, por conseguinte, transportar o número máximo de íons de analito da região da interface para o analisador de massas. Esta focagem é feita através de lentes eletrostáticas (iônicas), colimando assim o feixe de íons e focando-o na abertura de entrada do espectrómetro de massa (Thomas, 2001).

Na maioria dos ICP-MS a separação dos íons é realizada num quadrupolo (analisador utilizado no equipamento do LCA). O analisador de massas quadrupolo (Figura 8) consiste em quatro elétrodos num círculo ou em hipérbole, paralelos dois a dois, onde é aplicada uma diferença de potencial de corrente contínua (CC) e uma diferença de potencial de corrente alternada de radiofrequências (RF) a cada par de elétrodos (opostos entre si). A combinação destes potenciais determinará as trajetórias dos íons no interior do analisador.

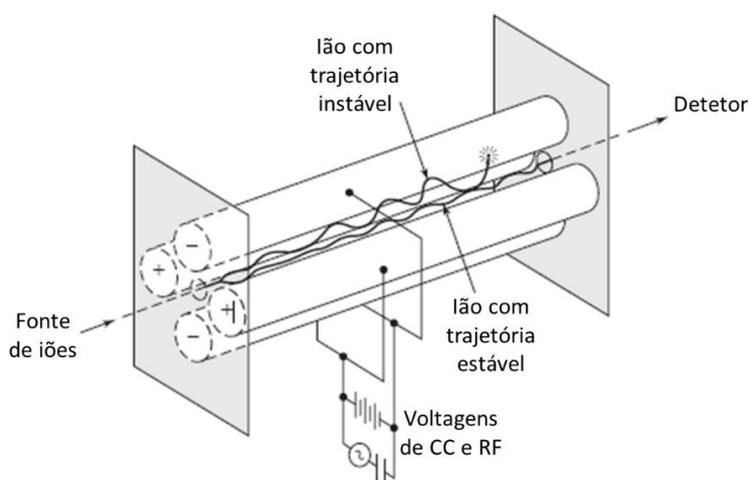


Figura 8 – Esquema do analisador de massas de um ICP-MS – quadrupolo (Skoog et al., 2013).

Os íons com uma determinada razão massa/carga possuem trajetórias estáveis no interior do quadrupolo e chegam ao detetor. Íons com razão massa/carga superior ou inferior aos que descrevem uma trajetória estável dentro do quadrupolo possuem uma trajetória instável e colidem com os eletrodos, não chegando ao fim deste percurso. Variando as voltagens aplicadas, vai-se fazendo um varrimento dos íons (com diferentes razões massa/carga), que têm um percurso estável dentro do analisador, e assim se vão separando e analisando à medida que chegam ao fim deste trajeto (Cazes, 2005; Skoog et al., 2013; Thomas, 2001).

Depois de serem separados no analisador, de acordo com a sua razão massa/carga, os íons atingem o detetor onde produzem um sinal cuja amplitude estará relacionada com o número de íons detetados. O detetor presente no equipamento de ICP-MS do LCA é um multiplicador de elétrons com dínodos discretos (Figura 9).

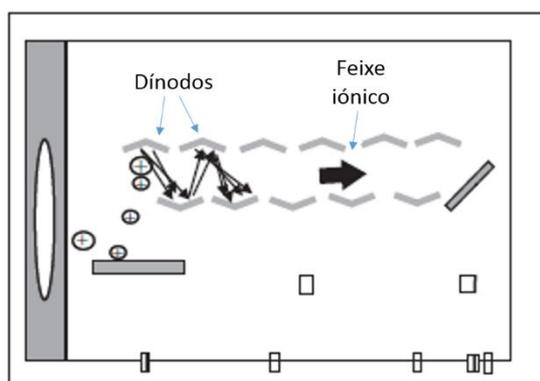


Figura 9 – Esquema de um multiplicador de elétrons com dínodos discretos (Hill, 2007).

O princípio de funcionamento deste detetor baseia-se na multiplicação dos elétrons. Quando um íon incide no primeiro dínodo provoca uma emissão secundária de elétrons que são acelerados para um segundo dínodo, causando nova emissão de elétrons e assim sucessivamente através de todos os dínodos. Este efeito em cascata produz uma amplificação de corrente medida, a qual pode ainda ser amplificada eletronicamente (Hill, 2007).

2.3.3. Interferências nas técnicas de ICP

As interferências que podem ocorrer nestas técnicas são interferências espectrais, de fundo e de matriz (devido a influências físicas ou químicas).

Em ICP-OES, problemas de interferências espectrais são comuns, devido ao elevado número de riscas de emissão produzidas pela fonte de plasma. Estes problemas podem ser

minimizados recorrendo a monocromadores de alta resolução ou fatores de correção inter-elementos. Outra alternativa é escolher uma linha de emissão a um comprimento de onda alternativo, embora isto possa provocar uma perda de sensibilidade. As interferências de fundo devem-se a espécies moleculares (tais como OH, próprio de matrizes aquosas) que originam bandas de emissão largas. Os efeitos deste tipo de interferências podem ser minimizados recorrendo a correção de fundo, quimiometria sofisticada, seleção cuidadosa das condições do plasma ou usando uma linha de emissão que seja menos afetada pela interferência de fundo. As interferências de matriz são mínimas, mas os efeitos físicos, tais como a viscosidade e efeitos de tensão superficial afetam a eficiência da nebulização, o que poderá influenciar a qualidade dos resultados. Para minimizar as interferências, poderá ser necessário usar padrões que tenham sido preparados no mesmo tipo de matriz existente nas amostras a analisar e recorrer ao uso de um padrão interno (ISO, 2007; ThermoElemental, 2001).

Em ICP-MS as interferências espectrais ocorrem quando espécies têm uma razão massa/carga muito próxima da do analito; são conhecidas como interferências isobáricas. Para resolver este problema são usadas relações matemáticas inter-elementares ou pode usar-se um outro isótopo menos abundante do analito, mas que não esteja tão sujeito a interferências, no entanto esta escolha tem consequências negativas em termos de sensibilidade. Outras possibilidades incluem o uso de um analisador com maior resolução e a aplicação de uma célula de colisões para quebrar iões moleculares. As interferências de fundo quase não existem em ICP-MS, no entanto, contaminações no branco e efeitos de memória podem causar ruído instrumental e comprometer o limite de deteção, tornando-se mais significativas em concentrações na gama das ng/L. Os efeitos de matriz podem ser um problema em ICP-MS, prejudicando a precisão da técnica e são resultado da utilização do gás árgon e também dos solventes e ácidos utilizados na preparação das amostras. Como tal deve-se ter cuidado na escolha destes reagentes, sendo preferencial o uso do ácido nítrico. Efeitos físicos tais como a viscosidade e tensão superficial na câmara de nebulização podem ser resolvidos como mencionado para ICP-OES (ISO, 2004, 2003; ThermoElemental, 2001).

São apresentadas no documento da Inorganic Ventures as diversas interferências que podem ocorrer para cada elemento, tanto em ICP-OES como em ICP-MS, assim como outras informações relevantes para análise desses elementos através destas técnicas (Inorganic Ventures, 2014). O documento "*Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission*

Spectroscopy, An Atlas of Spectral Information” existente no LCA possui informação acerca de possíveis interferentes espectrais na quantificação de elementos por ICP-OES. Para os elementos quantificados por ICP-MS foi consultada a norma ISO 17294 (ISO, 2004, 2003).

2.3.4. Algumas vantagens e limitações das técnicas com plasma

Em absorção atômica de chama (F-AAS), uma chama de ar/acetileno ou de óxido nitroso/acetileno pode ser usada para evaporar o solvente e para dissociar a amostra nos seus átomos correspondentes. Quando a luz de uma lâmpada de cátodo oco (selecionada com base no elemento a ser determinado) passa através da nuvem de átomos, os átomos de interesse absorvem a radiação da lâmpada. Esta é medida por um detetor e utilizada para calcular a concentração do referido elemento na amostra original (ThermoElemental, 2001).

A utilização de uma chama limita a temperatura a um máximo de cerca de 2600°C (com chama de N₂O/acetileno). Para muitos elementos, isso não é um problema. Por exemplo, Mn, Ni, Cd, Pb e os metais alcalinos são atomizados de forma eficiente em F-AAS e podem ser quantificados mesmo em concentrações na gama dos mg/L. No entanto existe um número de elementos refratários, como o V, Zr, Mo e B, que não têm um bom desempenho com uma atomização com chama. Isto deve-se ao facto de a temperatura máxima atingida ser insuficiente para decompor os compostos destes elementos. Como resultado, a sensibilidade da F-AAS para estes elementos não é tão satisfatória como noutras técnicas de análise elementar (ThermoElemental, 2001).

A técnica de absorção atômica com atomização em forno de grafite (GF-AAS) é semelhante à da chama, exceto que a chama é substituída por um pequeno tubo de grafite aquecido eletricamente, e que pode atingir temperaturas até 3000°C, para gerar uma nuvem de átomos. A maior densidade atômica e o maior tempo de residência da amostra na câmara de grafite, relativamente ao que acontece na chama, torna a sensibilidade da GF-AAS superior à da F-AAS, o que permite quantificar alguns elementos com concentrações na ordem dos µg/L. Contudo, devido à temperatura máxima que é possível ter no forno e ao uso de um material de grafite, os problemas associados à formação de compostos refratários ocorrem também neste tipo de técnica (ThermoElemental, 2001).

Num ICP-OES, as temperaturas atingidas são superiores às de F-AAS e GF-AAS e a maioria dos compostos refratários são atomizados eficientemente. Isto permite a quantificação de alguns elementos com concentrações várias ordens de magnitude inferiores

às concentrações mínimas quantificáveis por F-AAS. Este tipo de equipamentos permite também a quantificação de vários elementos por minuto, sendo uma técnica mais rápida que as anteriores. O ICP-MS é a técnica que oferece os melhores limites de detecção para a maioria dos elementos, normalmente em concentrações na gama dos ng/L (ThermoElemental, 2001).

Na Tabela 6 são comparadas algumas das características das técnicas de análise mencionadas.

Tabela 6 – Comparação de algumas características de técnicas de análise elementar.

	F-AAS	GF-AAS	ICP-OES	ICP-MS
Limites de detecção	Muito bons para alguns elementos	Excelente para alguns elementos	Muito bom para a maioria dos elementos	Excelente para a maioria dos elementos
Tempo de análise	10-15 segundos por elemento	3-4 minutos por elemento	1-60 elementos por minuto	Todos os elementos em menos de 1 minuto
Elementos aplicáveis	68	50	73	82

Apesar das vantagens inerentes às técnicas de ICP, estas também apresentam desvantagens como custos mais acrescidos dos equipamentos e associados à sua manutenção. No entanto, quando se pretendem analisar muitos elementos em pouco tempo e quando se têm muitas amostras para análise, os custos por análise de um elemento são menores e o ICP compensa em termos de custos relativamente a outras técnicas (ThermoElemental, 2001).

2.4. Reagentes e soluções

A água utilizada para a lavagem do material, para fazer as diluições e preparação de padrões foi água de classe 1. O sistema de ultrapurificação, Helix acoplado a um Milli-Q Element, garante resistividade de 18,2 MΩ.cm e carbono orgânico total \approx 1 µg/L.

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram, pelo menos, de grau de pureza p.a. Em particular, foram utilizados ácido nítrico a 65% (v/v) e peróxido de hidrogénio a 30% (v/v) (digestões).

Para avaliar as interferências espectrais no ICP-OES foram utilizados padrões monoelementares de cálcio, ferro e cobre.

Para a preparação dos padrões de calibração foram utilizados os padrões comerciais multielementares IV-ICPMS-71A e IV-ICPMS-71B da Inorganic Ventures.

Para a otimização diária da sensibilidade do equipamento de ICP-MS foi utilizada uma solução (Tune A) contendo Ba, Be, Bi, Ce, Co, In, Li, Ni, Pb, e U com concentração de 10 µg/L.

Como padrão interno, na técnica de ICP-MS, foi utilizada uma solução contendo Bi, Ga, In, Li, Sc, Tb e Y com concentração de 50 µg/L. O elemento monitorizado como padrão interno foi apenas o In (mais concretamente, o isótopo com 115 unidades de massa atômica).

A solução de branco utilizada para a determinação do ruído instrumental e para a preparação dos padrões de calibração e restantes padrões/soluções/diluições foi uma solução de ácido nítrico a 1% (v/v), resultante da diluição de ácido nítrico a 65% em água ultrapura. A solução de lavagem, utilizada entre leituras de amostras diferentes, foi uma solução de ácido nítrico a 2% (v/v).

Todos os padrões de calibração utilizados no ICP-MS foram preparados em frascos de plástico, por pesagem. Estes padrões foram preparados por diluição de uma solução mãe preparada também por diluição a partir de uma solução comercial multi-elementar. Os padrões de calibração utilizados no ICP-OES foram preparados de igual forma.

Os padrões de verificação do limite de quantificação (PVLQ) e os padrões de verificação da reta de calibração (PVRC) foram preparados da mesma forma que os restantes padrões do método descrito, diferindo apenas na solução mãe utilizada inicialmente, uma vez que esta deve ser independente da utilizada na preparação dos padrões de calibração (pelo menos de um lote diferente). Foram também utilizados como padrões de verificação da reta de calibração (PVRC) padrões provenientes dos ensaios de aptidão de águas (EAA) coordenados pela RELACRE.

2.5. Preparação de amostras

Neste trabalho foram utilizados dois tipos de materiais: material de referência certificado (MRC) e amostras de peixe (músculo), o que possibilitou a avaliação das diferentes características de desempenho do método em estudo.

O MRC utilizado neste trabalho foi o TORT-2, comercializado pelo National Research Council of Canada e apresentava-se sob a forma de um pó seco. As amostras de peixe foram utilizadas depois de liofilizadas e homogeneizadas. No entanto este material (amostras de peixe) nunca apresentou um grau de homogeneidade tão grande quanto o MRC e a sua granulometria era superior. O MRC permitiu avaliar a justeza do método e foi fundamental

para a sua validação; as amostras de peixe permitiram avaliar as limitações do método em relação à matriz em estudo, e permitiram obter uma avaliação mais fidedigna da precisão do método.

As digestões destes dois tipos de materiais foram feitas de igual forma. Antes da pesagem o MRC teve que ser agitado durante alguns minutos, de acordo com as especificações presentes no certificado que o acompanhava, de forma a homogeneizar o material e garantir que a amostragem efetuada era representativa. No caso das amostras de peixe esta agitação teve especial relevância, uma vez que estas amostras eram menos homogêneas que o MRC. Nas amostras de peixe, mesmo após moagem, verificou-se a existência de grânulos de diferentes tamanhos e na pesagem de uma porção de amostra de peixe foi importante garantir a representatividade da amostragem.

Para o processo de digestão foram pesados cerca de 100 mg, de amostra de peixe e de MRC, diretamente para os vasos de *teflon*, revestidos com papel de alumínio para minimizar a eletricidade estática que originava dispersão do material. De seguida, foi adicionado a cada vaso 1,5 mL de ácido nítrico concentrado. Posteriormente os vasos foram devidamente fechados e acomodados no carrossel e este colocado no forno de micro-ondas. Os vasos foram então sujeitos a um programa de digestão composto por 9 ciclos, de 3 minutos cada, de aquecimento com a potência adequada à carga existente no carrossel, alternados com ciclos de arrefecimento (com potência zero). A potência de aquecimento foi de 100% quando o carrossel estava completo (12 vasos) e $(100\% - 5\% \times n^\circ \text{ espaços vazios})$ nos casos em que o carrossel não estava completamente cheio. No fim do ciclo de digestão, o carrossel foi colocado na *hotte* até que os vasos arrefecessem, para depois poderem ser abertos. Adicionou-se então a cada vaso 100 μL de peróxido de hidrogénio e seguidamente os vasos foram colocados numa placa de aquecimento para evaporar até um volume de cerca de 0,5 mL. As soluções foram recolhidas e diluídas com água ultrapura até ao volume pretendido (25 mL), obtendo-se uma percentagem final de ácido de aproximadamente 2% (v/v).

2.6. Quantificação dos elementos de interesse por ICP

A utilização dos equipamentos de ICP é sempre antecedida de uma verificação do bom funcionamento dos mesmos (calibração do equipamento). No caso do ICP-MS foi necessário fazer uma otimização diária, previamente à análise (*auto-tune*), que compreendeu a

maximização do sinal correspondente ao isótopo ^{115}In (padrão interno) e minimização da formação de óxidos e espécies de carga dupla através da monitorização das razões $^{140}\text{Ce}^{16}\text{O}/^{140}\text{Ce}$ e $^{69}\text{Ga}/^{138}\text{Ba}$, respetivamente. Esta etapa teve como objetivo escolher as condições ideais de análise para o próprio dia. De seguida foram escolhidos os isótopos dos elementos que se pretendiam quantificar, bem como de possíveis interferentes. Seguidamente deu-se início à calibração analítica através da leitura do branco e dos padrões de calibração. A função de calibração foi definida com base nos padrões que apresentaram um erro relativo inferior a 10%. Por fim, seguiu-se a análise das amostras, sempre com soluções de controlo intercaladas para garantir a validade dos resultados.

Para se proceder à quantificação no ICP-OES selecionaram-se os comprimentos de onda que correspondiam ao máximo de emissão por parte dos analitos de interesse. Depois de estes estarem definidos procedeu-se à calibração através da leitura do branco e dos padrões de calibração. A função de calibração foi definida com base nos mesmos parâmetros que os mencionados para a técnica de ICP-MS, assim como a leitura das amostras intercaladas com soluções que permitiram controlar a qualidade dos resultados obtidos.

2.7. Desenvolvimento e validação de métodos de ensaio

Quando são utilizados métodos analíticos para a quantificação dos analitos de interesse, a qualidade dos resultados, assim como a qualidade dos instrumentos utilizados necessitam de ser avaliadas. Essa avaliação pode ser efetuada através da validação do método de ensaio, onde são estabelecidos e estudados os parâmetros de desempenho que o método deverá apresentar. O laboratório deverá estabelecer os critérios mínimos de desempenho do método, ou seja, estabelecer o controlo de qualidade que deverá ser aplicado aos resultados para que estes apresentem a qualidade exigida pelo laboratório (RELACRE, 2000).

Para promover as boas práticas laboratoriais e produzir resultados válidos, que apresentem qualidade é importante ter em conta alguns princípios (EURACHEM, 2014), nomeadamente: as medições analíticas deverão ser feitas com vista a satisfazer um requisito acordado (objetivo previamente definido); as medições analíticas deverão ser realizadas utilizando métodos e equipamentos que tenham sido testados, de forma a garantir que estes estão adequados à finalidade a que se destinam (cumprem os requisitos estabelecidos para um determinado procedimento); o pessoal responsável pela realização das medições analíticas deverá ser competente e qualificado para a devida execução desse tipo de tarefa;

deverá existir uma avaliação regular e independente do desempenho do laboratório; as medições analíticas obtidas num determinado laboratório devem ser coerentes com as realizadas noutros laboratórios; devem ser adotados procedimentos bem definidos de controlo e garantia da qualidade.

Os termos de validação e verificação são frequentemente confundidos. A validação é a definição da exigência analítica e a confirmação de que a metodologia se adequa para a aplicação pretendida. A validação de metodologias deve ser realizada para métodos não normalizados, métodos concebidos ou desenvolvidos pelo próprio laboratório, métodos normalizados utilizados fora do âmbito previsto e para extensões ou modificações de métodos normalizados. A verificação de uma metodologia é utilizada para confirmar se um laboratório tem capacidade para implementar um determinado método que foi previamente validado, por exemplo um método normalizado. Segundo o VIM (IPQ, 2012) a verificação é definida como o fornecimento de evidência objetiva de que um determinado método, cumpre os requisitos especificados. A verificação é uma comprovação de que um determinado método aplicado num contexto diferente, continua a cumprir as características de desempenho previamente estabelecidas pelo laboratório. Esse contexto diferente poderá por exemplo ser um novo laboratório ou um novo instrumento de análise. Apesar das diferenças nas características de desempenho do método, na validação e na verificação as ações a serem avaliadas são idênticas (EURACHEM, 2014; IPQ, 2012, 2005).

2.7.1. Parâmetros de desempenho do método avaliados neste trabalho

Para um laboratório apresentar qualidade, é necessário ter um nível adequado de confiança nos resultados produzidos. O laboratório, antes de efetuar a validação do método de ensaio, deve definir quais os parâmetros de desempenho que precisa avaliar para validar o método de ensaio. Segundo a NP ISO/IEC 17025 deve haver sempre um equilíbrio entre custos, riscos e possibilidades técnicas. Segue-se uma breve explicação sobre os parâmetros de desempenho que foram estudados e avaliados durante o processo de validação para a quantificação de metais em peixe utilizando técnicas com plasma indutivamente acoplado.

- **Seletividade**

Seletividade é a “propriedade dum método de medição, utilizado com um procedimento de medição especificado, segundo a qual o método fornece valores medidos para uma ou

várias mensurandas, tal que os valores de cada mensuranda sejam independentes uns dos outros ou de outras grandezas associadas ao fenômeno, corpo ou substância em estudo” (IPQ, 2012). É importante estabelecer durante a validação do método que este está a quantificar apenas o analito de interesse. Por outras palavras, o método deve ser livre de interferências que possam conduzir a um resultado incorreto (NATA, 2013). Refere-se seletividade analítica na medida em que o método pode ser utilizado para determinar os analitos específicos em matrizes mais ou menos complexas, sem interferências de outros componentes de comportamento química ou fisicamente semelhante que estejam presentes na matriz da amostra (Vessman et al., 2001).

Os termos seletividade e especificidade têm sido muitas vezes utilizados indiferentemente. A especificidade do método refere-se geralmente a um método que produz uma resposta para apenas um único analito, enquanto a seletividade do método refere-se a um método que proporciona respostas para um número de analitos que podem ou não ser distinguidos uns dos outros. Se a resposta do analito de interesse é distinta de todas as outras respostas dos componentes da matriz da amostra, o método diz-se seletivo. Uma vez que muito poucos métodos analíticos respondem apenas a um analito, o uso do termo seletividade é mais adequado do que especificidade e por conseguinte, para a validação de um método de ensaio, muitas vezes apenas é estudada a seletividade do método (NATA, 2013).

Normalmente nas matrizes alimentares, o processo de quantificação é precedido por um processo de digestão da amostra adequado à matriz em estudo, que permite eliminar alguns tipos de interferências de matriz nomeadamente as interferências de natureza orgânica. A baixa seletividade num método de ensaio é geralmente provocada pela existência de interferências espectrais, que produzem um erro de justeza no resultado da medição obtida (erro sistemático). Os efeitos de interferência de matriz são, na maioria, proporcionais ao sinal obtido (interferências proporcionais ou rotacionais), e provocam uma alteração no declive da função de calibração (sensibilidade). As interferências fixas ou translacionais são independentes da concentração do analito, influenciando apenas a ordenada na origem da função de calibração e é muitas vezes referido como *background* ou interferência da linha de base (EURACHEM, 2014).

Neste trabalho, a seletividade foi avaliada através do estudo de interferências de matriz e espectrais.

Para avaliar as interferências de matriz foram realizados testes de recuperação. Para efetuar estes testes, foram analisadas amostras de peixe e de MRC, onde previamente foi determinada a sua concentração e às quais foram adicionados volumes de soluções com concentrações conhecidas. A percentagem de recuperação foi determinada de acordo com a expressão:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{(C_f \times V_f) - (C_a \times V_a)}{(C_{adic} \times V_{adic})} \times 100$$

Equação 4

Onde:

C_f – Concentração do analito na amostra fortificada

C_a – Concentração do analito na amostra

C_{adic} – Concentração do analito na solução fortificante

V_f – Volume de amostra fortificada

V_a – Volume da amostra

V_{adic} – Volume da solução de reforço adicionada

No caso da técnica de ICP-OES, para identificar os possíveis interferentes espectrais, para posteriormente avaliar se seriam ou não significativos na quantificação dos analitos, consultou-se o *Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectroscopy, An Atlas of Spectral Information* existente no LCA. Com base nessa informação foram preparados padrões mono-elementares com os possíveis interferentes e estes padrões foram analisados nos comprimentos de onda a que interferiam. Os padrões que contêm o interferente não devem originar uma concentração, para o analito em estudo, superior ao LD para que a contribuição do interferente na quantificação do analito não seja relevante. Por outro lado, se o padrão que contém o interferente originar uma concentração, para o analito em estudo, superior ao LD deste, é necessário determinar a concentração do interferente que resulta numa concentração aparente do analito superior ao LQ.

Na técnica de ICP-MS, as interferências espectrais também são avaliadas através da análise de um padrão mono-elementar contendo o possível interferente. Este padrão é analisado com o objetivo de avaliar se a concentração obtida para o analito que sofre a interferência é significativa ou não (superior ou inferior ao LD). Se a concentração do interferente for significativa procede-se ao cálculo de um fator de interferência (f). O cálculo

de f permite definir uma função que relaciona os sinais do analito e da espécie interferente, permitindo uma correção dos resultados obtidos. Considera-se que f foi bem calculado quando se verifica, após a aplicação da correção, que a concentração para o analito em causa na análise do padrão contendo o interferente é inferior ao LD (ISO, 2004, 2003).

- **Sensibilidade**

A sensibilidade de um método de ensaio pode ser definida como o “quociente entre a variação numa indicação dum método de medição e a variação correspondente do valor da grandeza medida” (IPQ, 2012). A variação do sinal de resposta em função da variação da unidade de concentração do analito corresponde ao declive da função de calibração. Se a função de calibração for linear, a sensibilidade será constante e independente da concentração. Se a função de calibração não for linear, a sensibilidade dependerá da concentração do analito em estudo e não apresentará um valor constante (Skoog et al., 2013).

Um método de ensaio apresentará maior sensibilidade, quanto maior for a variação no valor do sinal analítico medido face à adição de pequenas concentrações do analito em estudo. Esse critério expressa a capacidade de o procedimento analítico gerar variação no valor da propriedade monitorizada ou medida, causada por um pequeno incremento na concentração ou grandeza do analito, sendo que o ideal é ser a maior possível. Assim, quanto maior for a variação do sinal medido causado por pequenos incrementos na concentração do analito, maior será a sensibilidade do método de ensaio (EURACHEM, 2014).

- **Limite de deteção e quantificação**

A determinação dos limites de deteção (LD) e quantificação (LQ) é importante para métodos destinados a quantificar analitos em concentrações muito baixas, ou seja, concentrações próximas destes limites. O limite de deteção pode ser definido como o teor mínimo medido, a partir do qual é possível detetar a presença do analito com uma confiança estatística razoável e o limite de quantificação é definido como a menor concentração medida a partir da qual é possível a quantificação do analito, com uma determinada exatidão. Estes limites podem ser divididos em dois componentes; limites do método e limites instrumentais (EURACHEM, 2014; IPQ, 2012; NATA, 2013).

O limite de deteção do método não deve ser confundido com a menor resposta instrumental. O uso de uma relação sinal-ruído de um padrão analítico analisado num

determinado equipamento é um indicador útil para avaliarmos o desempenho do equipamento, mas inadequado para estimar o limite de deteção de um método de ensaio. Cada equipamento tem uma limitação na grandeza de um analito que pode detetar sendo esta limitação muitas vezes dependente do equipamento. Esta limitação pode ser expressa como o limite de deteção instrumental, que pode ser definido como a menor grandeza de um analito que pode ser fiavelmente detetada ou diferenciada do *background* ou linha de base num instrumento (isto é, ruído instrumental) (NATA, 2013).

Da mesma forma que o limite de deteção, o limite de quantificação pode ser dividido em dois componentes, limite de quantificação do método e limite de quantificação instrumental. O limite de quantificação do método pode ser definido como a menor grandeza de analito que pode ser identificada e quantificada com um certo grau de fiabilidade numa determinada matriz (por um método de ensaio específico). O limite de quantificação instrumental pode ser definido como a menor grandeza de um analito que pode ser identificada e quantificada com uma determinada confiança estatística, utilizando determinado equipamento de medição (NATA, 2013).

Existem várias abordagens descritas na bibliografia para a estimativa dos limites de deteção e quantificação. Estas estimativas podem ser efetuadas recorrendo a brancos, com base nos parâmetros obtidos para a função de calibração ou define-se que o limite de quantificação corresponde ao padrão de menor concentração da função de calibração e conseqüentemente o limite de deteção é definido como sendo 1/3 do valor do limite de quantificação (EURACHEM, 2014).

Neste trabalho, os limites foram obtidos recorrendo à análise de brancos. O valor do LD situa-se acima do sinal médio do branco (\bar{x}_0), a cerca de 3 vezes o desvio-padrão do branco, enquanto o LQ se situa a 10 vezes o referido desvio-padrão (Equações 5 e 6) (IPAC, 2011).

$$(LD = \bar{x}_0 + 3,3s_0),$$

Equação 5

$$(LQ = \bar{x}_0 + 10s_0)$$

Equação 6

Para estimar estes limites foram analisadas soluções de branco (nos vários dias de análise) e brancos de digestão (lidos em condições de precisão intermédia) e estes valores

foram posteriormente comparados. Se por um lado a leitura dos brancos de solução permitiu avaliar o ruído instrumental e determinar a concentração que dá um sinal instrumental significativamente diferente do sinal de “fundo” por parte do equipamento, por outro, a leitura dos brancos de digestão permitiu determinar a concentração que dá um sinal instrumental significativamente diferente do sinal originado pela contribuição dos reagentes da digestão e possíveis contaminações ocorridas durante a etapa de digestão/preparação das amostras.

O valor do LQ foi verificado experimentalmente, pois para validar este limite foi necessário demonstrar a exatidão da quantificação nesta gama de concentração. Para esse efeito foi realizado um estudo, em condições de precisão intermédia, da quantificação do PVLQ. Este padrão de verificação do limite de quantificação consistiu numa solução aquosa contendo o analito de interesse numa concentração igual ao seu LQ.

O coeficiente de variação do sinal (desvio-padrão relativo, Equação 7), associado às três réplicas de leitura do sinal, para o PVLQ deve ser inferior a 10%. Só assim se garante a precisão do LQ.

$$CV_r(\%) = \frac{s_{ri}}{\bar{x}} \times 100$$

Equação 7

Onde:

s_{ri} – desvio-padrão associado às três réplicas de leitura do sinal

\bar{x} – média das três réplicas de leitura do sinal

O LQ foi ainda sujeito à avaliação da justeza através do cálculo do erro de justeza. A avaliação do erro de justeza envolveu o cálculo do erro relativo (E_r) (Equação 8).

$$E_r(\%) = \frac{C_{lab} - C_{ref}}{C_{ref}} \times 100$$

Equação 8

Onde:

C_{lab} – Concentração obtida pelo laboratório

C_{ref} – Concentração de referência

O LQ apenas é aceite quando apresenta uma precisão e justeza aceitáveis (limites de precisão e erro de justeza de 10%)

- **Quantificação**

Na etapa da calibração analítica, depois da leitura do branco e dos padrões de calibração, o *software* do equipamento procedeu ao cálculo das funções de calibração e respetivos erros relativos associados à análise dos padrões. As funções de calibração foram definidas com base nos padrões que apresentaram um erro relativo inferior a 10%. Para além desse requisito, o procedimento de validação de métodos internos de ensaio, do LCA, especifica que as funções de calibração devem ser contruídas com pelo menos 5 padrões ao longo da gama de trabalho e estas apenas serão aceites caso o coeficiente de correlação apresente um valor superior a 0,995. Apenas foram consideradas as funções de calibração que possuíam os requisitos mínimos estipulados pelo LCA.

No LCA, a calibração dos equipamentos de ICP é efetuada recorrendo ao modelo linear ponderado. O uso deste modelo deve-se ao facto de não existir homogeneidade de variâncias no sinal instrumental, neste caso, entre o padrão de menor concentração e o de concentração mais elevada (existe heterocedasticidade), sendo que a utilização da regressão linear através do método dos mínimos quadrados não é adequada nesta situação. As fórmulas de cálculo associadas ao modelo ponderado são semelhantes às do modelo linear não-ponderado, sendo introduzido um fator peso. O inverso da variância associada às três réplicas de leitura do sinal dos padrões de calibração, estabelecerá o peso que cada um desses padrões terá na obtenção da função de calibração. Se os pontos individuais (referentes a cada padrão de calibração) forem representados por (x_1, y_1) , (x_2, y_2) , etc., como é habitual, e os desvios padrões correspondentes por s_1 , s_2 , etc., então os pesos individuais, w_1 , w_2 , etc., serão calculados através da Equação 9.

$$W_i = \frac{s_i^{-2}}{\sum_i s_i^{-2}}$$

Equação 9

A utilização do divisor n no denominador da equação dos pesos dimensiona-os de modo a que a sua soma seja igual ao número de pontos (padrões) usados para calcular a função de calibração, o que simplifica os cálculos subsequentes (Miller e Miller, 2010).

Sendo a função linear ponderada representada por $y = b_w x + a_w$, o declive e interceção/ordenada na origem (“ponderados”), podem ser determinados de acordo com as seguintes expressões:

$$b_w = \frac{\sum_i w_i x_i y_i - n \bar{x}_w \bar{y}_w}{\sum_i w_i x_i^2 - n \bar{x}_w^2}$$

Equação 10

$$a_w = \bar{y}_w - b \bar{x}_w$$

Equação 11

Onde:

x_i – Valores individuais de concentração

y_i – Valores individuais de sinal

\bar{y}_w – Valores médios de sinal pesado

\bar{x}_w – Valores médios de concentração pesada

Apesar do *software* do equipamento proceder a esses cálculos, durante a validação de um método é essencial fazer uma verificação dos mesmos recorrendo a outro *software*; neste trabalho esta verificação/validação do *software* dos equipamentos de ICP foi realizada recorrendo ao *Microsoft Excel*.

O LCA utiliza o modelo de calibração linear ponderado para proceder à calibração analítica devido à inexistência de homocedasticidade da resposta instrumental. Normalmente, a variância associada às três réplicas de leitura do sinal aumenta à medida que a concentração aumenta. Ao aplicar o teste de homogeneidade de variâncias aos padrões que possuem menor e maior variância, normalmente, ao padrão de menor concentração e ao padrão de concentração mais elevado, verifica-se que, com base nas amostras utilizadas e com um grau de confiança de 95% há razões para acreditar que as variâncias são estaticamente diferentes (existe heterocedasticidade), justificando-se assim o uso da calibração ponderada.

O teste de homogeneidade de variâncias foi realizado através de um teste F, que usa a razão entre as variâncias associadas ao padrão com maior e menor variância, respetivamente (neste caso entre os padrões de maior e menor concentração, respetivamente). Depois de definida a hipótese do nulo como: "as variâncias são estatisticamente iguais" e a hipótese alternativa como: "as variâncias são estatisticamente diferentes" compara-se o valor obtido no teste com um valor de F tabelado, para um grau de confiança de 95% e $n - 1$ graus de liberdade (teste bilateral).

Se a hipótese nula for aceite, então a razão das variâncias deve ser próxima de 1. Se o valor de F excede um certo valor crítico (tabelado), então a hipótese nula é rejeitada. Este valor crítico de F depende do tamanho de ambas as amostras, do nível de significância e do tipo de ensaio que é realizado (Miller e Miller, 2010).

- **Gama de trabalho e linearidade da função de calibração**

Em qualquer método quantitativo existe uma gama de concentrações do analito na qual o método pode ser aplicado e que se denomina gama de trabalho. A gama de trabalho é o intervalo no qual o método fornece resultados com uma determinada incerteza, estimada pelo laboratório, e que deverá estar de acordo com os critérios de qualidade aceites pelo mesmo. A gama de trabalho corresponde, geralmente, à zona linear da função de calibração. A extremidade inferior da gama de trabalho é determinada pelo valor do limite de quantificação e a extremidade superior pela concentração a partir da qual o equipamento deixa de dar uma resposta linear. Durante a validação é necessário confirmar que o método de ensaio pode ser utilizado na gama de trabalho definida pelo laboratório, ou seja, a gama de trabalho definida pelo mesmo deverá apresentar linearidade (EURACHEM, 2014).

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um determinado intervalo de concentrações. O limite superior da gama de trabalho é normalmente definido como a concentração na qual o sinal analítico ou a inclinação da função de calibração se desvia por uma grandeza específica da relação linear. Os desvios da linearidade em concentrações elevadas podem dever-se à falta de linearidade de resposta do detetor (saturação do sinal no detetor) ou a efeitos químicos provenientes da matriz da amostra (Skoog et al., 2013).

Para este estudo, a gama de trabalho do método foi definida em $\mu\text{g/g}$ de peso seco. Uma vez que nas análises efetuadas por ICP se obtêm concentrações em $\mu\text{g/L}$, houve necessidade de se converterem essas concentrações para unidades de massa/massa. Refere-se como exemplo o cálculo do LQ do método (Equação 12).

Tendo em conta que este método foi efetuado com digestões contendo aproximadamente 100 mg de amostra/MRC (peso seco) para um volume final de aproximadamente 25 mL, os limites do método (massa/massa) foram calculados segundo a expressão:

$$LQ_{\text{método}} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right) (\text{peso seco}) = \frac{LQ_{\text{instrumental}} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{L}} \right) \times V_{\text{diluição}} (\text{L})}{m (\text{g})}$$

Equação 12

Onde o V = 0,025 L e m = 0,1g.

- **Exatidão (justeza, precisão e incerteza)**

A exatidão é o grau de concordância entre um valor medido e um valor verdadeiro dum mensuranda (IPQ, 2012). A avaliação da exatidão de um método analítico compreende o estudo de duas outras componentes: a justeza e a precisão. Os valores obtidos através destes dois parâmetros podem ser combinados numa única figura de mérito, a incerteza, estimando assim a exatidão do método analítico. Estes parâmetros estão associados aos diferentes tipos de erros que podem ocorrer durante a realização de um método analítico: erros sistemáticos e erros aleatórios (EURACHEM, 2014).

A Figura 10 evidencia as relações entre alguns conceitos usados para descrever a qualidade dos resultados de medição de um método analítico. A exatidão expressa o erro total do método analítico em estudo, combinando os erros aleatórios e sistemáticos (EURACHEM, 2014; Menditto et al., 2006).

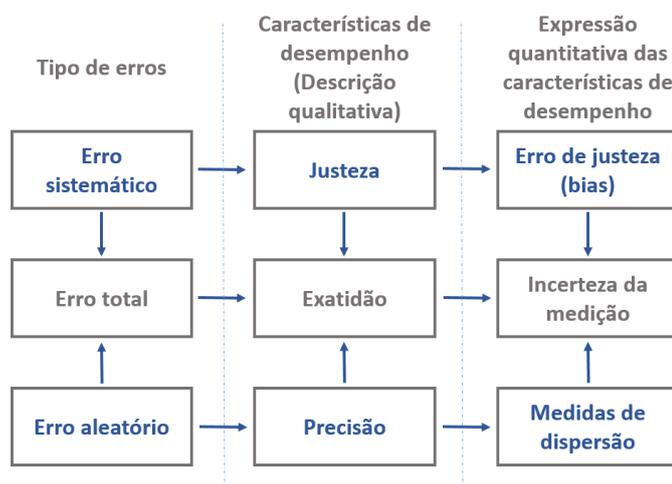


Figura 10 – Relações entre tipos de erros, características de desempenho e a sua expressão quantitativa.

- **Justeza**

A justeza de medição pode ser definida como o grau de concordância entre a média de um número infinito de valores medidos repetidos e um valor de referência. A justeza de uma medição está inversamente relacionada com o erro sistemático, ou seja, quanto maior for a

justeza do método de ensaio menor será o erro sistemático associado ao método. Porém a justeza de medição não está relacionada com o erro aleatório (IPQ, 2012).

Como não é possível efetuar um número infinito de medições a justeza não pode ser avaliada, mas é possível fazer uma estimativa prática dessa característica de desempenho do método em estudo, recorrendo ao “erro de justeza” que se baseia na comparação do valor médio de um conjunto de valores de medição, obtidos com o método analítico em estudo, e um determinado valor de referência. Existem várias abordagens para efetuar a estimativa do erro de justeza, tais como, a análise de materiais de referência, ensaios de recuperação e comparação dos resultados obtidos usando um método analítico de referência. A escolha da abordagem que deverá ser usada depende dos meios disponíveis do laboratório. Preferencialmente, para avaliar o erro de justeza do método em estudo, deverão ser usados materiais de referência certificados com o mesmo tipo de matriz e gama de concentrações previstas para as amostras em estudo (EURACHEM, 2014).

Neste trabalho foi avaliada a justeza associada à etapa de quantificação usando padrões de verificação da reta de calibração (PVRCs) e a justeza associada ao método com MRC.

Antes de demonstrar a justeza do método é essencial demonstrar que a etapa de quantificação se realizou nas condições apropriadas, garantindo que o equipamento executou a análise corretamente e produziu resultados válidos. Essa avaliação foi feita recorrendo ao erro de justeza de padrões de controlo que foram quantificados ao longo da análise. Foram utilizados vários padrões de controlo, mais especificamente padrões provenientes dos ensaios de aptidão de águas (EAA) coordenados pela RELACRE e padrões aquosos preparados no laboratório (PVRC e PVLQ). Deste modo foi possível cobrir a gama de concentrações de trabalho.

A justeza do método foi avaliada recorrendo ao MRC TORT-2. Calculou-se o erro de justeza associado à quantificação neste material (em condições de precisão intermédia) e este erro foi monitorizado através de uma carta de controlo.

Os erros de justeza foram determinados recorrendo ao cálculo do erro relativo, de acordo com a Equação 8 (concentrações em $\mu\text{g/L}$ ou em $\mu\text{g/g}$ consoante se estivesse a avaliar a justeza da etapa de quantificação ou a justeza do método).

- **Precisão**

A precisão ou fidelidade de uma medição pode ser definida como o grau de concordância entre indicações ou valores medidos, obtidos por medições repetidas, no mesmo objeto ou em objetos similares, sob condições especificadas. A precisão ou fidelidade de medição pode ser determinada através de estudos de repetibilidade de medição, através de estudos de precisão intermediária de medição e/ou através do estudo da reprodutibilidade de medição.

A precisão é geralmente expressa por parâmetros que descrevem a propagação dos resultados, calculados a partir dos resultados obtidos através da realização de medições repetidas sobre um material adequado sob condições especificadas. As condições de repetibilidade e reprodutibilidade correspondem aos dois extremos de variabilidade, mínima e máxima, respetivamente. Existe ainda uma situação intermédia, que corresponde às condições de precisão intermediária, em que a variabilidade associada é superior à verificada nos resultados obtidos em condições de repetibilidade, mas inferior à verificada nos resultados obtidos em condições de reprodutibilidade. O estudo sob condições de precisão intermédia do método de ensaio é essencial para a obtenção de estimativas confiáveis das características de desempenho. O estudo da precisão intermédia deve ser efetuado tendo em conta todas as variações nas condições operacionais que podem ser esperadas durante o uso rotineiro do método. Assim, o seu objetivo é avaliar a variabilidade típica do método em estudo em rotina e não a variabilidade mínima. O objetivo do estudo da precisão de um método de ensaio é obter uma estimativa que reflita todas as fontes de variação que ocorrerão num único laboratório em condições de rotina (diferentes analistas, escala de tempo prolongado, diferentes partes do equipamento, etc.) (EURACHEM, 2014; IPQ, 2012).

Uma vez que, quase sempre, o desvio-padrão dos valores obtidos na análise de várias réplicas de uma mesma amostra aumenta com o aumento da concentração de analito, é necessário escolher várias concentrações, dentro da gama de trabalho definida, para determinar o desvio-padrão associado ao método em estudo. As réplicas para efetuar o estudo de precisão deverão ser independentes. A análise de variância (ANOVA) é uma das ferramentas matemáticas mais usadas para a avaliação da precisão de métodos analíticos. As variâncias calculadas durante o processo de avaliação da precisão permitem determinar limites de precisão (de repetibilidade, reprodutibilidade e precisão intermediária), ou seja, valores que permitem decidir, com um determinado nível de confiança, se existe uma diferença significativa entre os resultados obtidos na análise de duas réplicas nas mesmas

condições de precisão. Considera-se que existem diferenças significativas quando a diferença absoluta entre dois valores, obtidos nas mesmas condições de precisão, é superior ao valor calculado para o limite de precisão (EURACHEM, 2014).

Neste trabalho, as condições de precisão avaliadas foram a repetibilidade e a precisão intermédia. A reprodutibilidade não foi avaliada, porque envolve a execução do método desenvolvido num outro laboratório. O estudo da repetibilidade envolveu o a análise dos coeficientes de variação obtidos em condições de repetibilidade e da diferença relativa obtida em análises de duplicados.

➤ **Repetibilidade**

Desvio padrão relativo (DRP) associado à leitura instrumental

No LCA, o sinal adquirido na análise de cada solução corresponde à média dos sinais obtidos em três réplicas. Assim, é obtido um desvio-padrão relativo (DPR), que consiste num coeficiente de variação (de repetibilidade) da leitura instrumental. Esse parâmetro permite avaliar possíveis *drifts* que possam ocorrer durante a etapa de quantificação, constituindo uma importante ferramenta de controlo de qualidade dos resultados. O coeficiente de variação da leitura instrumental permite conhecer a concentração mínima a partir da qual se consegue quantificar determinado analito com uma precisão satisfatória, pois este coeficiente tem tendência a aumentar com a diminuição da concentração, ou seja, quando se efetuam medições próximas do LQ do equipamento utilizado na deteção.

Coefficiente de variação de repetibilidade

A repetibilidade associada à etapa de quantificação por ICP foi avaliada recorrendo à análise do PVLQ, tendo este sido analisado várias vezes num mesmo dia de análise. Estas leituras não foram sempre efetuadas sucessivamente, i.e., foram intercaladas com outro tipo de amostras, de modo a obter a maior variabilidade possível na análise. A repetibilidade associada ao método foi avaliada através da leitura de réplicas de digestão independentes (porções de MRC, ou peixe, digeridas em vasos diferentes, no mesmo ciclo de digestão). As diferentes réplicas de digestão foram lidas sucessivamente, ou, intercaladas com outras amostras (amostras assinaladas com * na Tabela 13). O facto de se efetuarem leituras sucessivamente ou intercaladas com outras amostras permitiu avaliar a dimensão da variabilidade associada ao processo de digestão/preparação das amostras de peixe e também

a variabilidade associada a todo o método, i.e., a variabilidade associada ao processo de digestão/preparação das amostras de peixe conjuntamente com a variabilidade associada ao processo de quantificação.

A repetibilidade foi avaliada recorrendo ao cálculo do coeficiente de variação de repetibilidade (CV_r) das várias réplicas de leitura/digestão da mesma amostra. Este coeficiente foi obtido através do cálculo do desvio padrão relativo, de acordo com a Equação 7, em que a média e o desvio padrão dizem respeito às réplicas de leitura/digestão.

Procedeu-se, também, ao cálculo dos valores de $HORRAT_r$ para cada amostra de peixe. Este valor foi obtido através da razão entre o CV_r obtido e o mesmo valor estimado a partir da equação de Horwitz, na concentração de interesse, de acordo com as Equações 1 e 2.

Avaliação de duplicados

A avaliação da repetibilidade foi também realizada recorrendo à análise de duplicados, pois esse é o número de réplicas característico quando o método é aplicado em rotina. Foram representadas cartas de controlo para a diferença relativa entre leituras dos duplicados da mesma solução e de soluções independentes, correspondentes a réplicas de digestão. O cálculo da diferença relativa entre as análises dos duplicados foi realizado de acordo com a expressão:

$$Diferença\ relativa\ (\%) = \frac{C_2 - C_1}{\bar{C}} \times 100$$

Equação 13

Onde:

C_1 e C_2 – Concentrações obtidas na leitura da amostra e do duplicado, respetivamente

\bar{C} – Média das concentrações obtidas na leitura dos duplicados

Concentrações em $\mu\text{g/L}$ ou $\mu\text{g/g}$, consoante se tratassem de duplicados de leitura ou de digestão, respetivamente.

➤ Precisão intermédia

A precisão intermédia (s_I) foi estimada recorrendo à análise de amostras de peixe, ao MRC e ao PVLQ. Cada solução foi analisada sob condições de precisão intermédia, através da análise de réplicas de leitura/digestão em dias diferentes. Esta estimativa foi efetuada

recorrendo à análise de variâncias (ANOVA, de fator único) de acordo com o Anexo C do guia da EURACHEM (EURACHEM, 2014).

A s_I de um método pode ser calculada através da combinação das duas componentes da variância, a variância dentro dos grupos e entre grupos. A variância dentro dos grupos está relacionada somente com as réplicas efetuadas em condições de repetibilidade enquanto a variância entre grupos está relacionada com a distribuição de todas as réplicas dessa mesma amostra.

Na Tabela 7 está representada a estrutura de uma tabela de ANOVA, de fator único, que neste trabalho foi obtida recorrendo à ferramenta de análise de dados do *Microsoft Excel*. Nessa tabela, p corresponde ao número de grupos, n corresponde ao número de leituras obtidas em condições de repetibilidade, em cada grupo. O número total de determinações (N) é dado pelo produto de n por p .

Tabela 7 – Esquema da tabela ANOVA utilizada neste trabalho (EURACHEM, 2014).

Fonte de variação	Soma dos quadrados (SQ)	Graus de liberdade	Média da soma dos quadrados (MQ)	Teste F
Entre grupos	$SQ_{entre\ grupos}$	$p - 1$	$MQ_{entre\ grupos} = \frac{SQ_{entre\ grupos}}{p - 1}$	$\frac{MQ_{entre\ grupos}}{MQ_{dentro\ do\ grupo}}$
Dentro do grupo (resíduos)	$SQ_{dentro\ do\ grupo}$	$N - p$	$MQ_{dentro\ do\ grupo} = \frac{SQ_{dentro\ do\ grupo}}{N - p}$	
Total	$SQ_{total} = SQ_{entre\ grupos} + SQ_{dentro\ do\ grupo}$	$N - 1$		

O desvio-padrão associado à repetibilidade (s_r) foi obtido através da expressão:

$$s_r = \sqrt{MQ_{dentro\ do\ grupo}}$$

Equação 14

A contribuição da variância proveniente da variação entre grupos foi obtida de acordo com a expressão:

$$s_{entre\ grupos} = \sqrt{\frac{MQ_{entre\ grupos} - MQ_{dentro\ do\ grupo}}{n}}$$

Equação 15

A precisão intermédia (s_I) foi obtida através da combinação das duas componentes da variância, a dentro dos grupos e entre grupos, de acordo com a expressão:

$$s_I = \sqrt{s_r^2 + s_{entre\ grupos}^2}$$

Equação 16

Por fim, a precisão intermédia foi transformada numa grandeza relativa, para facilitar a interpretação dos resultados. Essa conversão foi realizada através do cálculo do coeficiente de variação associado à precisão intermédia de acordo com a expressão:

$$CV_{s_I} (\%) = \frac{s_I}{\bar{x}} \times 100$$

Equação 17

Onde \bar{x} representa a média aritmética das N leituras consideradas.

Os coeficientes de variação associados à precisão intermédia foram estimados a partir do padrão PVLQ, do MRC e de amostras de peixe, abrangendo a gama de trabalho. Foram ainda calculados os valores de $HORRAT_{s_I}$ da mesma forma que já anteriormente mencionado.

- **Incerteza**

A incerteza da medição pode ser definida como um parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a uma mensuranda, com base nas informações disponíveis utilizadas (IPQ, 2012).

Embora a incerteza não seja uma característica de desempenho de um método analítico, mas sim uma propriedade dos resultados obtidos usando esse método de medição, é possível proceder à sua estimativa recorrendo aos dados recolhidos no processo de validação, e esse parâmetro constitui uma forma de se quantificar a exatidão do método analítico avaliado (EURACHEM, 2014).

Existem várias formas de calcular a incerteza, distinguindo-se duas abordagens principais: “*bottom-up*” (“de baixo para cima”) e “*top-down*” (“de cima para baixo”). De forma simplificada, a primeira abordagem consiste em identificar todas as características do método analítico que podem contribuir para a incerteza do resultado final, estimar as contribuições de cada uma, atribuindo-lhe um valor numérico, e combiná-las de forma a obter um valor final. A segunda abordagem visa simplificar a estimativa da incerteza, reduzindo a quantidade de cálculos necessários, através do agrupamento de alguns termos de incerteza num termo único, por exemplo, um termo de incerteza associado à precisão que corresponda à contribuição de várias fontes de incerteza. Portanto, na abordagem “*top-down*” o número total de termos a considerar na estimativa da incerteza global torna-se menor. Cada uma das estratégias tem as suas vantagens e desvantagens, e a escolha da estratégia mais adequada depende das características do método analítico considerado (EURACHEM, 2014; IPAC, 2007; ISO, 2012).

A metodologia utilizada neste trabalho para estimar a componente de incerteza associada à quantificação de diversos metais em peixe por técnicas com plasma indutivamente acoplado, foi através da análise do MRC, de acordo com a norma ISO 11352:2012 (IPAC, 2007; ISO, 2012).

A incerteza foi estimada considerando as componentes dos efeitos aleatórios e sistemáticos. A componente associada aos efeitos aleatórios foi estimada com base na precisão intermédia (representa a precisão ao longo do tempo na rotina do laboratório) enquanto a componente associada aos efeitos sistemáticos foi estimada com base na justeza do método. Por fim, estas duas componentes foram combinadas para obter uma estimativa global da incerteza.

A componente de incerteza associada à precisão (u_{Rw}), expressa na forma de incerteza-padrão relativa, foi calculada recorrendo à determinação do desvio-padrão relativo das medições efetuadas no MRC em condições de precisão intermédia, de acordo com a expressão:

$$u_{Rw,rel} = \frac{s_{Rw}}{\bar{x}}$$

Equação 18

Onde:

s_{Rw} – Desvio-padrão dos resultados obtidos nas determinações do MRC

\bar{x} – Concentração média obtida nas análises do MRC

A componente de incerteza associada à justeza (u_b), expressa na forma de incerteza-padrão relativa, foi calculada tendo em consideração três componentes:

a) A incerteza-padrão relativa do valor de referência do MRC ($u_{Cref,rel}$):

$$u_{Cref,rel} = \frac{U_{MRC}/k}{C_{ref}}$$

Equação 19

b) O erro relativo associado às leituras do MRC, ou *bias* relativo (b_{rel}):

$$b_{rel} = \frac{\bar{x} - C_{ref}}{C_{ref}}$$

Equação 20

c) O coeficiente de variação dos valores medidos no MRC ($C_{V,b}$), que é igual à componente da incerteza relativa para a precisão:

$$C_{V,b} = u_{Rw,rel}$$

Equação 21

Usando esses dados, a componente de incerteza associada à justeza (u_b), expressa na forma de incerteza-padrão relativa foi calculada segundo a expressão:

$$u_{b,rel} = \sqrt{b_{rel}^2 + \left(\frac{C_{V,b}}{\sqrt{n_M}}\right)^2} + u_{c,ref,rel}^2$$

Equação 22

Onde:

U_{MRC} – Incerteza expandida associada a cada analito no MRC

k – Fator de expansão referido no certificado de análise do MRC

C_{ref} – Concentração indicada no certificado do MRC

n_M – Número de leituras efetuadas ao MRC

Por fim, a incerteza-padrão combinada (u_c), expressa na forma de incerteza-padrão relativa é dada pela contribuição dos efeitos aleatórios e dos efeitos sistemáticos e foi determinada de acordo com a expressão:

$$u_{c,rel} = \sqrt{u_{Rw,rel}^2 + u_{b,rel}^2}$$

Equação 23

A incerteza-expandida (U), expressa na forma de incerteza-padrão relativa, foi obtida a partir da multiplicação da incerteza-padrão por um fator de expansão $k = 2$, para se obter a incerteza expandida com um nível de confiança de cerca de 95%.

$$U_{rel} = k \times u_{c,rel}$$

Equação 24

Por fim, para verificar a adequação do método à finalidade pretendida procedeu-se ao cálculo da incerteza-padrão de medição máxima de acordo com a Equação 3 e este valor foi comparado com a incerteza obtida para o método.

2.7.2. Controlo de qualidade utilizado neste trabalho

Existem várias ferramentas necessárias para avaliar os parâmetros da validação e a qualidade das análises efetuadas por ICP para a quantificação de metais em peixe; são elas: a análise de brancos, análise de amostras em duplicado, testes de recuperação, materiais de referência certificados e padrões internos de verificação. As seguintes ferramentas foram utilizadas para realizar essa avaliação:

1) Brancos: neste trabalho foram utilizados dois tipos de brancos:

- Branco de solução e de calibração: solução de HNO_3 1% (v/v). Este tipo de branco permitiu avaliar o ruído instrumental e assim determinar os limites instrumentais e verificar a existência de efeitos de memória ao longo da etapa de análise.

- Branco de digestão: solução de branco que foi sujeita a todo o processo analítico juntamente com as amostras. Esta solução foi preparada num vaso de digestão, ao qual foram adicionados os reagentes, sem qualquer tipo de amostra, e que foi sujeito a todo o processo de digestão. Este controlo permitiu avaliar se existiu alguma contaminação por parte dos reagentes ou até por parte de vasos mal lavados, durante a etapa de digestão.

2) Digestão de amostras em duplicado: a preparação de amostras, efetuadas em duplicado, permitiu avaliar a precisão do método de ensaio (EURACHEM, 2014).

3) Testes de recuperação (*spikes*): os analitos de interesse foram adicionados, intencionalmente, às amostras em análise (amostras com concentração de analito desconhecidas). Foi necessário ter cuidado com a fortificação efetuada, a fim da concentração total de analito na amostra não exceder a gama de trabalho. Os testes de recuperação destinaram-se a avaliar os efeitos de matriz (EURACHEM, 2014).

4) Material de referência certificado (MRC): material externo ao laboratório, que possui a mesma matriz da amostra em estudo e vem acompanhado com um certificado que tem informação sobre a concentração e a incerteza associada a cada analito. Os materiais de referência certificados foram utilizados para avaliar a justeza de medição do método de ensaio em estudo (EURACHEM, 2014).

5) Padrões internos de verificação: soluções mono-elementares ou multi-elementares, preparadas no laboratório através de soluções padrão comerciais, que contêm os analitos que se pretende quantificar. Estas soluções foram utilizadas para avaliar a precisão da etapa de quantificação e para verificar a justeza da função de calibração (EURACHEM, 2014).

3. Apresentação e discussão de resultados

Os métodos validados neste trabalho foram a quantificação de Mn e Sr por ICP-MS e de Cu, Fe e Zn por ICP-OES, para a matriz peixe. Para esse efeito foi utilizado como referência o procedimento de validação de métodos internos de ensaio, do LCA (DQ.PSQ.019).

Será apresentado como exemplo o trabalho desenvolvido para validar a quantificação de manganês por ICP-MS. Os restantes métodos validados seguiram um processo idêntico de análise e tratamento de resultados.

3.1. Validação do método de quantificação de Mn em peixe por ICP-MS

3.1.1. Seletividade

Para avaliar a seletividade do método foram efetuados estudos de interferências.

- **Avaliação de interferências de matriz – Testes de recuperação**

Na Figura 11 é apresentada a carta de controlo referente às percentagens de recuperação de Mn obtidas nas análises das soluções fortificadas. Nalguns casos são apresentadas várias leituras para um mesmo dia (mas com diferentes níveis de fortificação em diferentes amostras), e como tal, possíveis tendências aparentes não significam que o processo esteja fora de controlo.

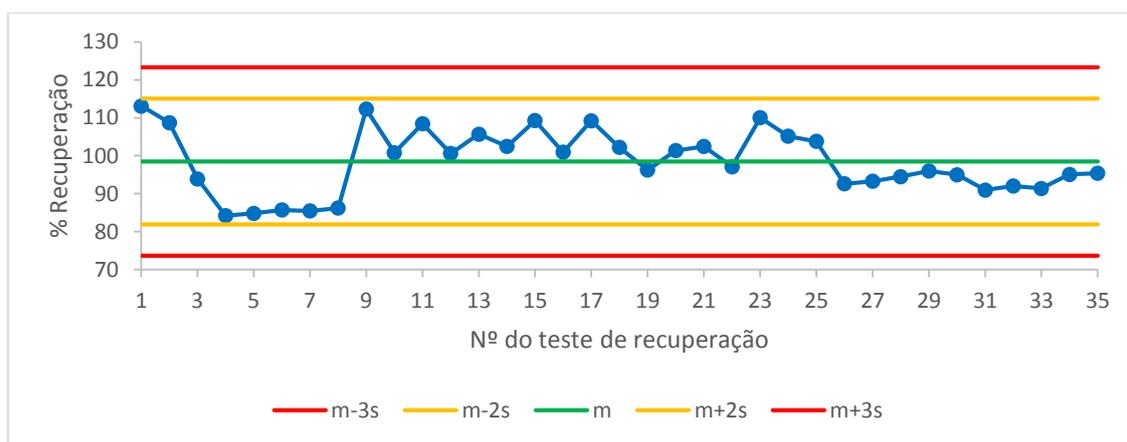


Figura 11 – Carta de controlo das percentagens de recuperação de Mn.

A Figura 11 permite verificar que a recuperação média de Mn em soluções fortificadas foi de 98%. Nos 35 ensaios de recuperação realizados foram obtidas recuperações compreendidas entre os 84 e os 113%, o que está de acordo com os critérios de aceitação

estabelecidos pelo laboratório (o LCA estabeleceu que as recuperações devem estar compreendidas entre 80 e 120%).

Os testes de recuperação foram executados em dias diferentes, foram adicionadas diferentes grandezas de analito a diferentes amostras (7 amostras de peixe) que possuíam diferentes concentrações, garantindo a obtenção de resultados na gama de trabalho do analito de interesse. Para um determinado nível de fortificação (por exemplo, 20 ppb de Mn) feito em dias diferentes, não se verificaram percentagens de recuperação sistematicamente acima ou abaixo dos 100%. Com base nos dados obtidos, pode concluir-se que a quantificação de Mn em peixe por ICP-MS não apresenta interferências de matriz significativas.

As cartas de controlo correspondentes ao processo de validação dos restantes elementos mencionados anteriormente são apresentadas nas Figuras 22, 33, 44 e 55. Para todos os analitos as cartas de controlo apresentam distribuição de resultados idênticas à obtida para o Mn. As percentagens de recuperação variaram entre 81-114% para o Sr, 90-112% para o Cu, 85-112% para o Fe e 81-115% para o Zn, estando de acordo com os limites estabelecidos pelo laboratório (80 a 120%).

- **Avaliação de interferências espectrais**

O estudo de interferências espectrais na quantificação de Mn por ICP-MS não foi realizado uma vez que após a consulta da literatura, se considerou não existirem interferentes relevantes na quantificação deste elemento, para a matriz em estudo. Também para a quantificação de Sr por ICP-MS e Fe por ICP-OES, não se realizou este estudo pelos motivos já mencionados.

Para a quantificação de Cu e Zn por ICP-OES foi realizado o estudo de interferentes. O *Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectroscopy, An Atlas of Spectral Information*, indica que o Fe e o Ca são possíveis interferentes na quantificação de Cu e que o Cu e o Fe são possíveis interferentes na quantificação de Zn. O estudo de interferências espectrais na quantificação de Cu e Zn, por ICP-OES, foi realizado através da leitura de padrões monoelementares de Fe, Ca e Cu. Estes padrões foram preparados com concentrações superiores às expectáveis no peixe. Ao demonstrar que estas concentrações elevadas (dos possíveis interferentes) não causam uma interferência significativa na quantificação do analito (concentração > LD) demonstra-se que quaisquer concentrações de

interferentes existente no peixe (inferiores às testadas) não causarão interferências na quantificação desse analito.

As concentrações destes padrões de possíveis interferentes originaram concentrações aparentes, para o Cu e para o Zn inferiores aos seus LD ($3 \mu\text{g/L}$ para o Cu e $4 \mu\text{g/L}$ para o Zn). Assim, conclui-se que para o método de quantificação de Cu e Zn em peixe, por ICP-OES, as interferências são desprezáveis. Na Tabela 29 e na Tabela 46 são apresentadas as concentrações aparentes de Cu e Zn, lidas nos padrões monoelementares dos elementos interferentes.

3.1.2. Limites de detecção e quantificação

Nas Figuras 12 e 13 são apresentadas as cartas de verificação dos valores absolutos das concentrações de Mn obtidas durante a análise dos brancos de solução e de digestão.

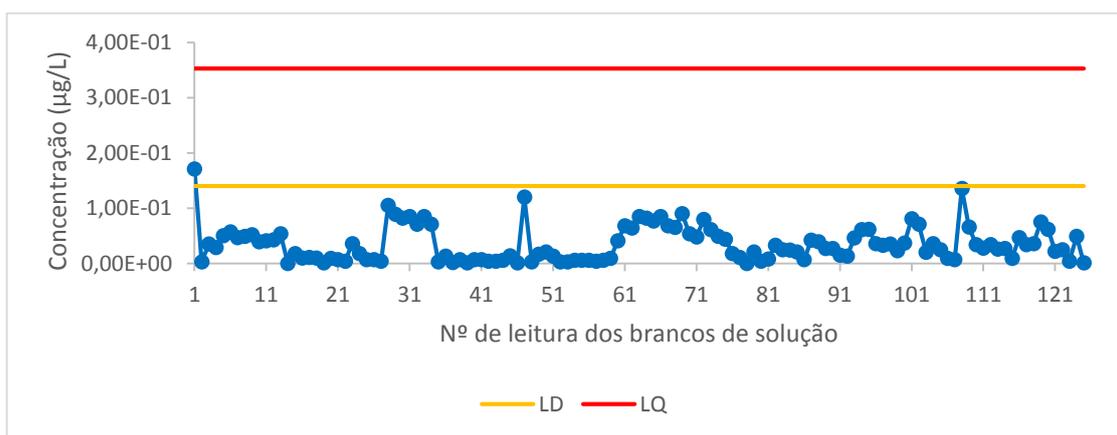


Figura 12 – Carta de verificação dos brancos de solução para o Mn.

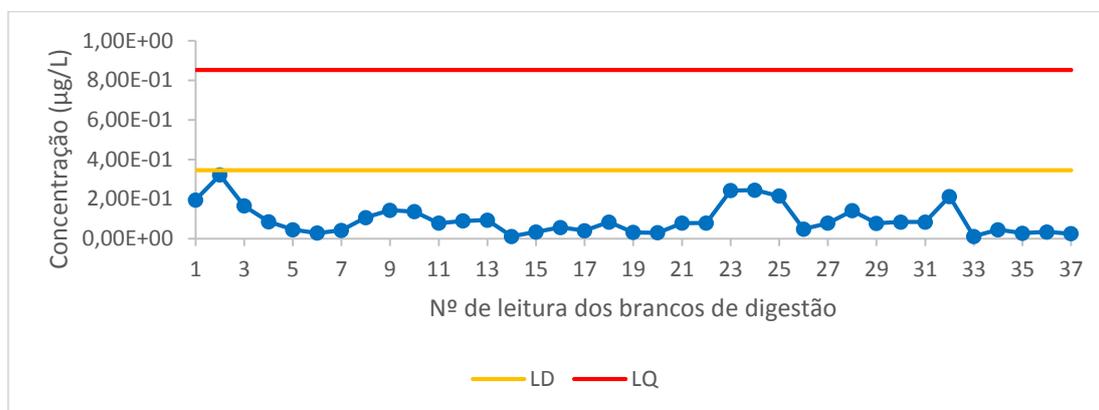


Figura 13 – Carta de verificação dos brancos de digestão para o Mn.

As linhas apresentadas nas cartas de verificação correspondem ao LD e LQ calculados a partir de um conjunto de brancos. Esses limites são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Limite de detecção e de quantificação do Mn.

Equação	Branco de solução	Branco de digestão
$LD = \bar{x}_0 + 3,3s_0$	1,40E-01 $\mu\text{g/L}$	3,45E-01 $\mu\text{g/L}$ (8,63E-02 $\mu\text{g/g}$)
$LQ = \bar{x}_0 + 10s_0$	3,53E-01 $\mu\text{g/L}$	8,52E-01 $\mu\text{g/L}$ (2,13E-01 $\mu\text{g/g}$)

Os limites (LD e LQ) calculados através dos brancos de digestão são superiores aos calculados através dos brancos de solução. Esta diferença pode ser devida a alguma pequena grandeza de analito que possa ter sido introduzida durante a etapa de digestão/preparação das amostras. Serão estes os limites mais adequados, ficando estabelecido como limite de quantificação para o Mn a concentração de 1 $\mu\text{g/L}$ (0,25 $\mu\text{g/g}$).

O valor do LQ foi verificado experimentalmente através da análise do PVLQ (1 $\mu\text{g/L}$).

Verificou-se que o coeficiente de variação do sinal associado às três réplicas de leitura do sinal, para o PVLQ e para todas as soluções aquosas/amostras de peixe com concentrações próximas do LQ foi sempre inferior a 10%. Assim comprovou-se a precisão na quantificação de Mn nesta gama de concentração (LQ).

O LQ foi ainda sujeito à avaliação da justeza. Na Figura 14 é apresentada a carta de controlo do erro de justeza da quantificação de Mn no PVLQ (1 $\mu\text{g/L}$).

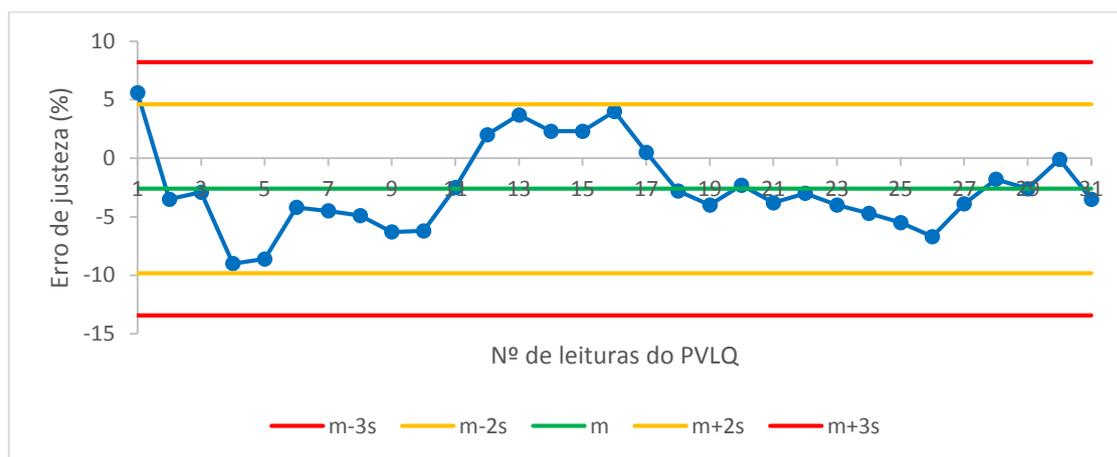


Figura 14 – Carta de controlo do erro de justeza da quantificação de Mn no PVLQ.

Verifica-se que o módulo do erro de justeza associado à leitura de padrões com concentração de 1 $\mu\text{g/L}$ (0,25 $\mu\text{g/g}$) não ultrapassa os 10%, o que está de acordo com os

requisitos estipulados pelo LCA para a justeza do LQ. A justeza do LQ deve continuar sob avaliação, sendo de esperar que com o aumento do número de determinações o erro de justeza médio atinja valores mais baixos.

O coeficiente de variação do sinal tanto do PVLQ como de amostras com concentrações próximas do LQ foi inferior aos limites estipulados pelo LCA e a justeza do LQ foi comprovada com base no erro de justeza do PVLQ, o que demonstrou a exatidão da quantificação de Mn nesta gama de concentrações.

As cartas de verificação dos brancos de solução/de digestão relativas à quantificação de Sr por ICP-MS e Cu, Fe e Zn por ICP-OES encontram-se nas Figuras 23/24; 34/35; 45/46; 56/57, respetivamente. Pode observar-se que para o Mn e o Sr tanto os brancos de solução como os brancos de digestão se encontram abaixo do LQ e que pontualmente há brancos de solução e de digestão que se encontram entre o LD e LQ, indicando pequenas contaminações. Para os restantes analitos em estudo (Cu, Fe e Zn), podemos observar que tanto os brancos de solução como os brancos de digestão se encontram abaixo do LD. Nas Tabelas 21, 30, 38 e 47 podem ser encontrados os limites de deteção e quantificação dos respetivos elementos. Os limites de quantificação que ficaram estabelecidos para os elementos em estudo foram 1 µg/L (0,25 µg/g) para o Sr, 7 µg/L (1,75 µg/g) para o Cu, 8 µg/L (2 µg/g) para o Fe e 12 µg/L (3 µg/g) para o Zn. Os valores calculados para o LQ do Zn foram inferiores aos que ficaram estabelecidos (LQ calculado através dos brancos de digestão para o Zn foi de 9 µg/L (2,25 µg/g)), no entanto durante a avaliação da justeza da quantificação de Zn nessa gama de concentração verificou-se um erro de justeza superior a 10%. Por este motivo considerou-se necessário aumentar a concentração para 12 µg/L (3 µg/g), de forma a obter uma justeza de acordo com os critérios estabelecidos pelo laboratório. Nas Figuras 25, 36, 47 e 58 podem verificar-se as cartas de controlo do erro de justeza dos PVLQs para os analitos em estudo. Os erros de justeza variaram entre -9 a 6% no caso do Mn; -5 a 6% no caso do Sr; -4 a 10% para o Cu; -9 a 10% para o Fe e -10 a 6% no caso do Zn. Como trabalho futuro, será importante que o PVLQ continue sob avaliação uma vez que ainda foram realizadas poucas determinações.

3.1.3. Quantificação

As funções de calibração foram definidas no início de cada análise e foram calculadas pelo *software* do equipamento. Apresenta-se de seguida o exemplo do cálculo de uma das funções de calibração obtidas durante o processo de validação. Esta verificação foi realizada para a função de calibração obtida, para o Mn, no dia 27 de abril de 2016. Os cálculos foram efetuados de acordo com as Equações 9, 10 e 11. Nas Tabelas 9, 10 e 11 são apresentados os parâmetros calculados para a construção dessa função de calibração linear ponderada. Na Figura 15 é apresentada a função obtida, que veio confirmar o resultado calculado pelo *software* do equipamento, validando assim os cálculos do mesmo.

Tabela 9 – Valores para a definição da função de calibração linear ponderado do Mn do dia 27/04/2016.

Padrão	Conc. (µg/L)	Média Sinal (cps)	si	si ²	1/si ²
P0	0,00	9,50E+02	5,43E+01	2,94E+03	3,40E-04
P0,1	0,10	1,50E+03	9,61E+01	9,24E+03	1,08E-04
P0,5	0,50	3,54E+03	1,46E+02	2,12E+04	4,71E-05
P1	0,98	6,33E+03	1,96E+02	3,83E+04	2,61E-05
P5	4,91	2,83E+04	4,05E+02	1,64E+05	6,11E-06
P10	9,90	5,58E+04	4,57E+02	2,09E+05	4,79E-06
P20	19,59	1,09E+05	3,57E+02	1,27E+05	7,85E-06
P100	98,51	5,37E+05	2,53E+03	6,42E+06	1,56E-07
Soma	134,48	7,42E+05	4,24E+03	6,99E+06	5,40E-04
Média	16,81	9,28E+04	5,31E+02	8,74E+05	6,75E-05

Tabela 10 – Valores para a definição da função de calibração linear ponderado do Mn do dia 27/04/2016 (continuação).

Padrão	Conc. (µg/L)	wi	wi*xi	wi*yi	wi*xi*yi	wi*xi ²
P0	0,00	5,03E+00	0,00E+00	4,78E+03	0,00E+00	0,00E+00
P0,1	0,10	1,60E+00	1,64E-01	2,41E+03	2,45E+02	1,67E-02
P0,5	0,50	6,98E-01	3,45E-01	2,47E+03	1,22E+03	1,71E-01
P1	0,98	3,87E-01	3,80E-01	2,45E+03	2,40E+03	3,73E-01
P5	4,91	9,05E-02	4,44E-01	2,56E+03	1,26E+04	2,18E+00
P10	9,90	7,09E-02	7,02E-01	3,96E+03	3,92E+04	6,95E+00
P20	19,59	1,16E-01	2,28E+00	1,27E+04	2,48E+05	4,46E+01
P100	98,51	2,31E-03	2,27E-01	1,24E+03	1,22E+05	2,24E+01
Soma	134,48	8,00E+00	4,54E+00	3,25E+04	4,25E+05	7,67E+01
Média	16,81	1,00E+00	5,67E-01	4,06E+03	5,32E+04	9,58E+00

Tabela 11 – Valor do erro residual (%) para o Mn nos padrões de calibração.

Padrão	Conc. (µg/L)	Sinal Calculado (cps)	Resíduos	Erro residual (%)	[Mn] calculada	Erro relativo (%)
P0	0,00	9,47E+02	2,35E+00	0,25	0,00	-
P0,1	0,10	1,51E+03	-8,06E+00	-0,54	0,10	1,4
P0,5	0,50	3,67E+03	-1,27E+02	-3,60	0,47	4,7
P1	0,98	6,34E+03	-1,18E+01	-0,19	0,98	0,2
P5	4,91	2,79E+04	4,35E+02	1,54	4,98	1,6
P10	9,90	5,53E+04	4,59E+02	0,82	9,98	0,8
P20	19,59	1,09E+05	2,93E+02	0,27	19,64	0,3
P100	98,51	5,42E+05	-4,99E+03	-0,93	97,60	0,9

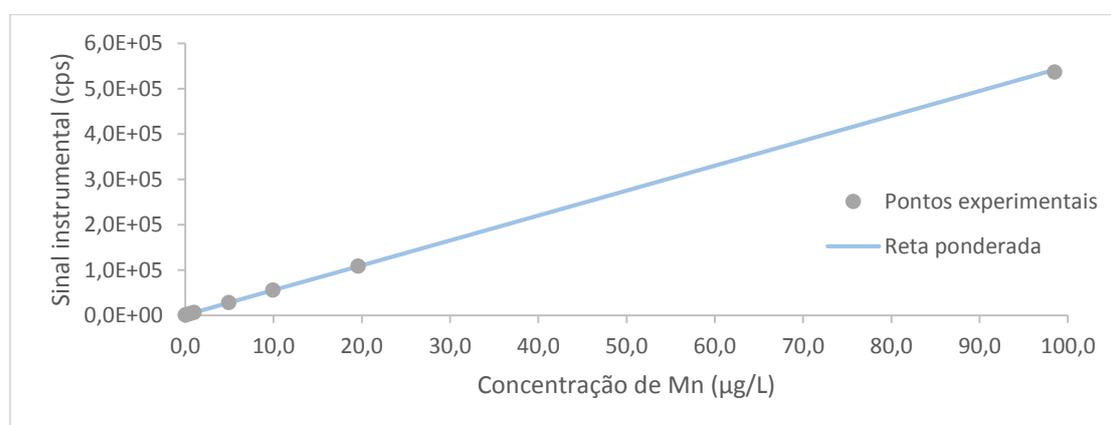


Figura 15 – Função de calibração para a quantificação do Mn no dia 27/04/2016.

No contexto deste trabalho foram obtidas 7 funções de calibração válidas, para a quantificação de Mn por ICP-MS. Na Tabela 12 são reunidos os parâmetros dessas funções de calibração. É apresentado o declive, a ordenada na origem e o coeficiente de correlação. Estas funções de calibração foram construídas com pelo menos 5 padrões de calibração ao longo da gama de trabalho e verificou-se que em todas elas o coeficiente de correlação foi superior a 0,995 (critérios estabelecidos pelo laboratório).

Tabela 12 – Parâmetros das funções de calibração obtidas para o Mn.

Data	b_w	a_w (cps)	a_w (µg/L)	r
02/03/2016	6057	469	7,74E-02	0,9999
22/03/2016	5793	501	8,65E-02	0,9999
05/04/2016	3938	531	1,35E-01	0,9999
21/04/2016	6254	857	1,37E-01	0,9999
27/04/2016	5493	947	1,72E-01	0,9999
10/05/2016	7116	2563	3,60E-01	0,9999
24/05/2016	8898	2150	2,42E-01	0,9999

A gama de trabalho instrumental, para a quantificação de Mn em peixe por ICP-MS, para a qual se realizou o estudo de validação, ficou estipulada entre 1 e 100 $\mu\text{g/L}$. Estes limites correspondem ao LQ e ao padrão de maior concentração, respetivamente. A gama de trabalho do método foi obtida através da conversão destes valores em massa seca, de acordo com a Equação 12. A gama de trabalho do método obtida para a quantificação de Mn em peixe foi de 0,25 a 25 $\mu\text{g/g}$ (peso seco).

Para verificar a linearidade da relação entre o sinal instrumental e a concentração do analito procedeu-se ao cálculo do coeficiente de correlação (r), como já mencionado anteriormente, e à análise do gráfico dos erros residuais. Na Figura 16 estão representados os erros residuais associados aos diferentes padrões de calibração utilizados para o cálculo da função de calibração do Mn, no dia 27/04/2016.

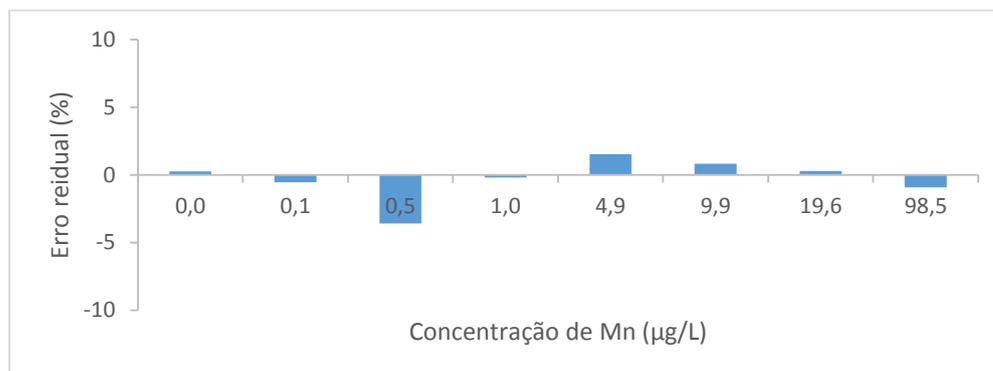


Figura 16 – Erro residual associado aos diferentes padrões de calibração para o Mn, no dia 27/04/2016.

Como se pode observar na Figura 16 e na Tabela 11, o erro residual encontra-se bastante próximo de zero (o critério do LCA são 10%) e verifica-se que não existem mais de três resíduos positivos ou negativos consecutivos. Pode concluir-se que o erro residual não apresenta tendências e está uniformemente distribuído, comprovando-se assim a adequabilidade da função de calibração calculada (linear ponderada) aos resultados obtidos.

Com base no coeficiente de correlação (r) e na análise do erro residual conclui-se que o modelo linear ponderado descreve de forma adequada a resposta instrumental do ICP-MS em função da concentração de Mn.

A validação do *software* do equipamento também foi realizada para os restantes elementos validados neste trabalho e essa informação e os parâmetros das funções de calibração desses elementos são apresentados nos anexos 6.1 a 6.4: Sr (Tabelas 22 a 25 e

Figuras 26 e 27), Cu (Tabelas 31 a 34 e Figuras 37 e 38), Fe (Tabelas 39 a 42 e Figuras 48 e 49) e Zn (Tabelas 48 a 51 e Figuras 59 e 60). Para os restantes elementos em estudo as conclusões foram as mesmas que as obtidas para o Mn. Para o Sr e Fe obtiveram-se 4 erros residuais negativos e positivos, respetivamente, consecutivos. No entanto, em ambos os casos esse erro apresenta um valor reduzido (erro máximo em módulo de 3%). No caso do Cu e do Zn não se verificaram quaisquer tendências.

As gamas de trabalho instrumentais validadas foram as seguintes: 1-100 $\mu\text{g/L}$ para a quantificação de Sr por ICP-MS; 7-320 $\mu\text{g/L}$; 8-320 $\mu\text{g/L}$; 12-320 $\mu\text{g/L}$ para a quantificação de Cu, Fe e Zn, respetivamente, por ICP-OES. As gamas de trabalho do método que foram validadas foram as seguintes: 0,25-25 $\mu\text{g/g}$ para a quantificação de Sr por ICP-MS e 1,75-80 $\mu\text{g/g}$; 2-80 $\mu\text{g/g}$; 3-80 $\mu\text{g/g}$ para a quantificação de Cu, Fe e Zn, respetivamente, por ICP-OES.

3.1.4. Justeza / veracidade

Neste trabalho foi avaliada a justeza associada à etapa de quantificação e a justeza associada ao método.

Na Figura 17 está representada a carta de controlo do erro de justeza associado à leitura dos padrões de controlo (PVRCs). O erro de justeza foi obtido através do cálculo do erro relativo, de acordo com a Equação 8 (concentrações em $\mu\text{g/L}$).

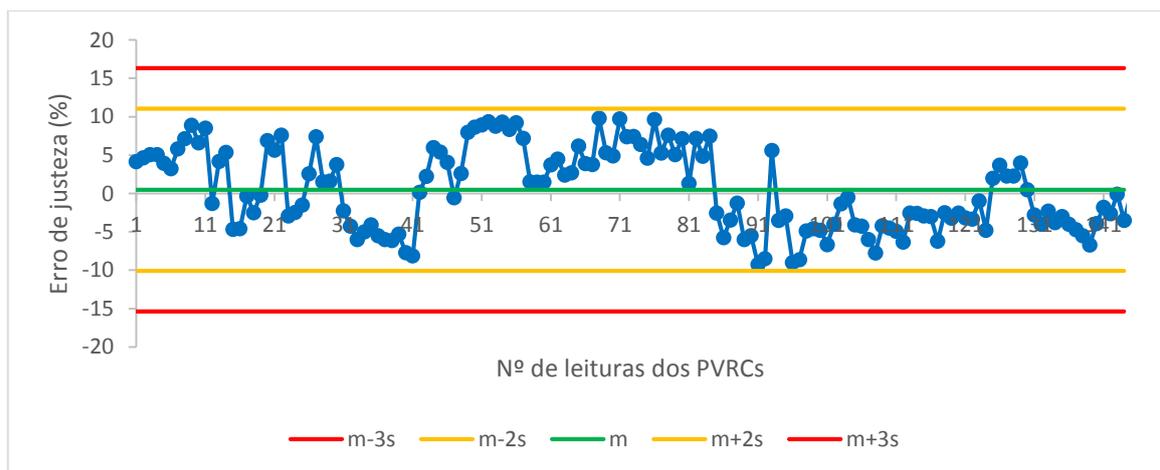


Figura 17 – Carta de controlo do erro de justeza na quantificação do Mn nos PVRCs.

Como se pode verificar, o valor médio tende a aproximar-se do erro de justeza nulo, no entanto verificam-se alguns desvios que podem estar associadas a contaminações dos

padrões de controlo ou a alguma instabilidade instrumental. Este erro apresentou-se sempre dentro dos limites aceitáveis (10%). De notar que a carta de controlo apresentada contém os erros de justeza associados a diferentes padrões, com concentrações diferentes e que, em cada dia de análise foram lidas um número diferente de soluções. Os erros obtidos apresentaram um módulo do erro de justeza inferior a 10%, podendo-se concluir que as etapas de quantificação de Mn por ICP-MS estiveram sob controlo.

A justeza do método foi avaliada recorrendo ao MRC TORT-2. Na Figura 18 está representada a carta de controlo do erro de justeza, das várias leituras (em dias diferentes), das 23 digestões independentes do MRC realizadas neste trabalho.

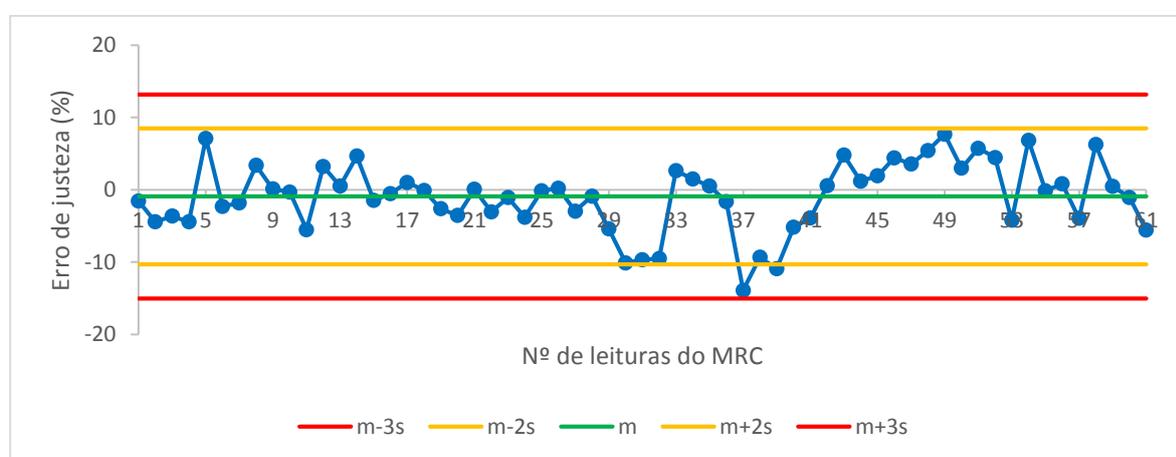


Figura 18 – Carta de controlo do erro de justeza na quantificação do Mn no MRC.

O erro de justeza médio aproximou-se de zero, mas em casos pontuais verificaram-se valores para o módulo do erro de justeza próximos de 15%, provavelmente decorrentes de algum erro no processo de digestão/preparação do MRC e/ou algum *drift* durante a etapa de quantificação. Com base nos resultados obtidos, pode concluir-se que os requisitos para o erro de justeza do método, estipulados pelo LCA, são adequados à quantificação do Mn em amostras de peixe por ICP-MS (módulo do erro de justeza máximo de 15%).

As cartas de controlo relativas ao erro de justeza associado à etapa de quantificação e ao erro de justeza associado ao método de ensaio (MRC) para os elementos Sr, Cu, Fe e Zn são apresentadas nas Tabelas 28/29; 39/40 50/51 e 61/62, respetivamente. As etapas de quantificação para todos os elementos apresentaram-se sob controlo, uma vez que os erros de justeza se encontraram dentro dos limites estabelecidos pelo laboratório (10%). Quanto ao erro de justeza associado ao MRC TORT-2, obtiveram-se erros de justeza nos intervalos:

-14 a 8% para o Mn; -13 a 14% para o Sr; -9 a 9% para o Cu; -12 a 8% para o Fe e -9 a 15% no caso do Zn. Para o Sr, Cu e Fe não se verificaram tendências. Para o Zn verificou-se que o erro de justeza diminui ao longo do tempo; esta tendência poderá dar indicação de que os erros de justeza próximos de 15% nos primeiros dias de análise poderiam estar relacionados com contaminação e, de facto, verificou-se que a situação foi resolvida através de uma lavagem mais cuidada dos vasos de digestão.

3.1.5. Precisão

- **Desvio padrão relativo associado à leitura instrumental**

Na Figura 19 estão representados os desvios padrão relativos (%), obtidos na leitura das várias soluções analisadas no decorrer da validação do método da quantificação de Mn em peixe por ICP-MS.

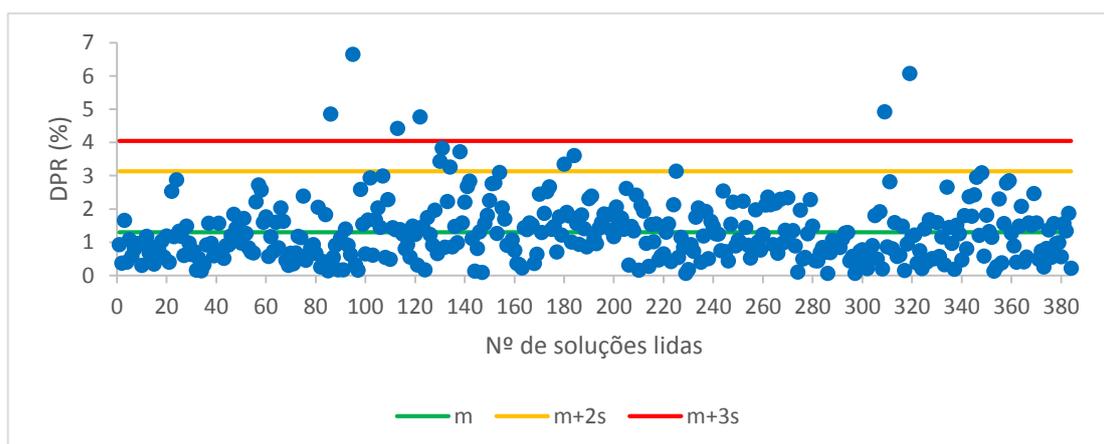


Figura 19 – Carta de controlo dos desvios padrões relativos (%) na quantificação de Mn por ICP-MS.

O valor médio obtido para o desvio padrão relativo (DRP) foi de aproximadamente 1,5% e não se obtiveram valores próximos dos 10% (valor limite estipulado pelo LCA). Com base nos resultados obtidos pode-se redefinir o critério de aceitação dos DPR para 7%, uma vez que não foram observados valores superiores a este.

As cartas de controlo relativas aos desvios padrões relativos obtidos na quantificação de Sr, Cu, Fe e Zn em peixe são apresentadas nas Figuras 30, 41, 52 e 63, respetivamente. Os desvios padrão relativos máximos foram: 6% para o Sr, 9% para o Cu, 9% para o Fe e 7% para o Zn. Como tal, pode-se redefinir/diminuir o critério de aceitação dos DPR para esses mesmos valores.

- **Coefficiente de variação de repetibilidade**

Na Tabela 13 estão representados os CV_r estimados através das análises de Mn em amostras de peixe, MRC TORT-2 e padrões de verificação por ICP-MS e os valores de $HORRAT_r$ que foram obtidos de acordo com o regulamento (CE) N° 333/2007.

Tabela 13 – Valores de CV_r (%) e de $HORRAT_r$ estimados para o Mn.

Amostra	CV_r (%)	N° de leituras por amostra	$HORRAT_r$
MRC TORT-2	3	10	0,20
MRC TORT-2	2	10	0,16
C.J.F	10	8	0,55
S.C.G *	9	6	0,54
C.J.F	10	8	0,53
S.C.G	6	6	0,37
I	4	10	0,22
H	6	10	0,33
S.C.G	5	6	0,28
PVLQ *	4	10	
PVLQ *	3	10	
PVLQ	2	10	

A Tabela 13 permite observar que as soluções que apresentam menor CV_r são o PLVQ e o MRC TORT-2. De notar que na solução PVLQ a variabilidade se deve apenas à etapa de quantificação (matriz simples / duplicados de leitura) e no caso do MRC TORT-2 o material era muito homogêneo. Para as amostras de peixe foram obtidos valores de CV_r superiores e estes são devidos essencialmente à heterogeneidade das amostras e também às concentrações de Mn existentes nestas, que eram mais baixas que as presentes no MRC.

Os valores de $HORRAT_r$ obtidos para as amostras estudadas foram inferiores a 2, o que permite concluir que a repetibilidade do método foi satisfatória.

Os valores de $HORRAT_r$ e os valores de CV_r (%) estimados para os elementos Sr, Cu, Fe e Zn são apresentados nas Tabelas 26, 35, 43 e 52, respetivamente. As conclusões obtidas para esses elementos são idênticas às obtidas para o Mn, uma vez que para todos os analitos em estudo os valores de $HORRAT_r$ foram inferiores a 2, considerando-se assim que a repetibilidade dos métodos foi satisfatória.

- **Avaliação de duplicados**

As cartas de controlo para os valores das diferenças relativas (%) dos duplicados de leitura/digestão são apresentadas na Figura 20 e na Figura 21. Um duplicado de leitura consistiu numa amostra de peixe digerida num vaso de digestão e posteriormente analisada por ICP duas vezes e um duplicado de digestão consistiu numa amostra de peixe digerida em dois vasos de digestão diferentes, mas num mesmo ciclo de digestão e analisada por ICP uma vez.

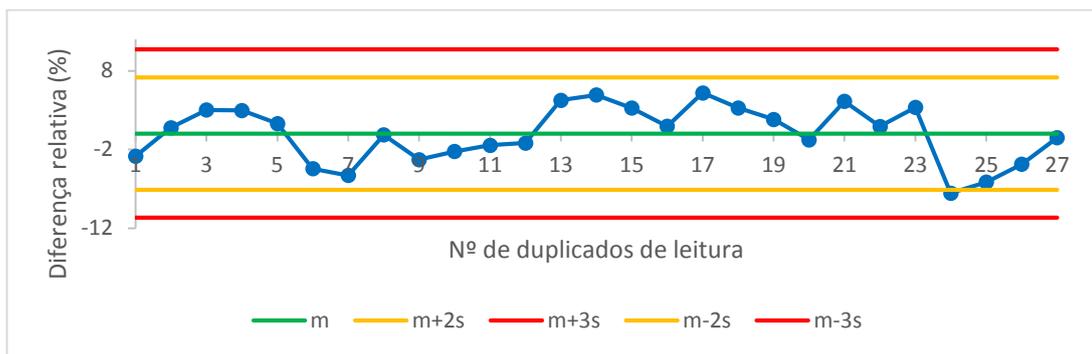


Figura 20 – Carta de controlo para os valores das diferenças relativas (%) dos duplicados de leitura de amostras de peixe.

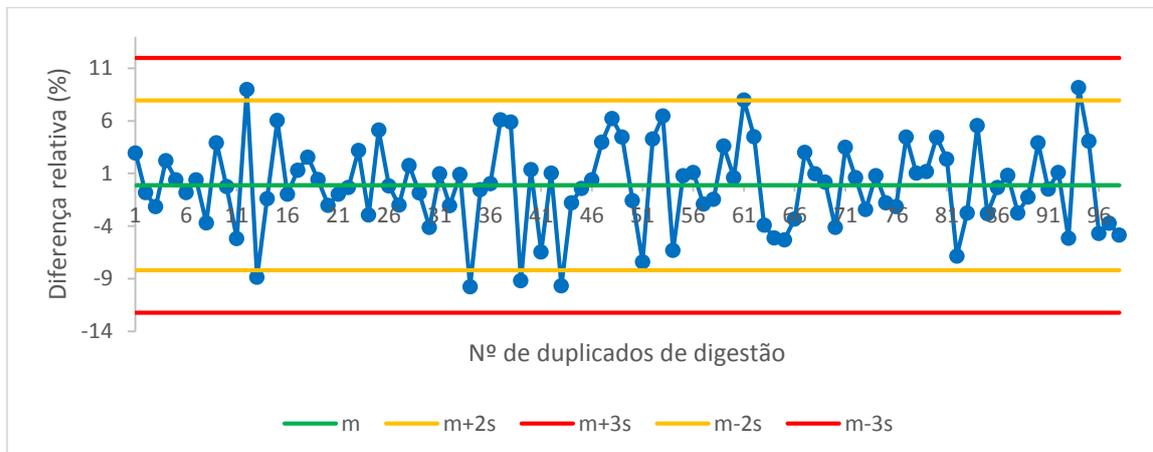


Figura 21 – Carta de controlo para os valores das diferenças relativas (%) dos duplicados de digestão de amostras de peixe.

O módulo da diferença relativa para os duplicados de leitura foi sempre inferior a 10% (critério estipulado pelo laboratório). O número de análises realizadas, de duplicados de leitura, foi inferior ao número de duplicados de digestão. No entanto esta última avaliação de repetibilidade será mais importante uma vez que neste caso os duplicados foram sujeitos a todo o procedimento do método de ensaio.

As diferenças relativas obtidas para os duplicados de digestão foram afetadas por dois tipos de repetibilidade, que contribuíram para a variabilidade dos resultados: a repetibilidade associada à etapa de digestão/preparação da amostra e a repetibilidade associada à leitura instrumental. Por este fato, as diferenças relativas obtidas para os duplicados de digestão foram superiores, comparativamente às obtidas para os duplicados de leitura. Esta diferença pode também ser explicada devido à heterogeneidade das amostras de peixe, pois verificou-se que os módulos das diferenças relativas obtidas para os duplicados de digestão de MRC foram inferiores comparativamente aos obtidos para as amostras de peixe.

As cartas de controlo para os valores das diferenças relativas dos duplicados de leitura/digestão do Sr, Cu, Fe e Zn são apresentadas nas Figuras 31/32, 42/43, 53/54 e 64/65, respetivamente. As conclusões retiradas dessas cartas de controlo são idênticas às conclusões apresentadas para Mn.

- **Precisão intermédia**

Na Tabela 14 estão representados os vários CV_{S_I} (%), assim como o número de grupos (p) e o número de leituras obtidas em condições de repetibilidade em cada grupo (n), utilizados para a obtenção desses valores e os valores de $HORRAT_{S_I}$ correspondentes.

Tabela 14 – Valores de CV_{S_I} (%) e de $HORRAT_{S_I}$ estimados para o Mn.

AMOSTRA	CV_{S_I} (%)	n	p	$HORRAT_{S_I}$
MRC TORT-2	4	9	3	0,36
C.J.F	10	8	3	0,55
S.C.G	10	6	3	0,56
i	6	5	2	0,34
H	7	5	2	0,36
PVLQ	4	10	3	

A Tabela 14 permite verificar que os valores de CV_{S_I} mais baixos dizem respeito às matrizes mais simples, enquanto para as amostras de peixe foram obtidos valores mais elevados. Esta discrepância já tinha sido observada na avaliação da repetibilidade. Pode concluir-se que um dos fatores que influencia a precisão do método é a heterogeneidade das amostras de peixe e a gama de concentrações (concentrações mais baixas – coeficientes de

variação mais elevados). Os valores de $HORRAT_{S_I}$ obtidos foram todos inferiores a 2 e por isso pode concluir-se que a precisão intermédia correspondeu aos requisitos especificados.

Através da avaliação da precisão intermédia conseguiu demonstrar-se que as medições efetuadas em condições de rotina laboratorial se mantêm relativamente estáveis. O valor máximo de CV_{S_I} obtido foi de 10%, para duas amostras de peixe e o valor de $HORRAT_{S_I}$ máximo foi de 0,56 e 0,55, também para as mesmas amostras de peixe.

Os coeficientes de variação associados à precisão intermédia e respetivos valores de $HORRAT_{S_I}$ estimados para os elementos Sr, Cu, Fe e Zn são apresentados nas Tabelas 27, 36, 44 e 53, respetivamente. As conclusões retiradas dessas tabelas foram as mesmas que as obtidas para o Mn. Apenas, no caso do Sr, foi obtido um valor de CV_{S_I} de 11% para uma amostra de peixe.

3.1.6. Incerteza da medição

Na Tabela 15 é apresentado o valor obtido para a estimativa da incerteza associada à quantificação de Mn em peixe por ICP-MS, assim como a componente associada à precisão (efeitos aleatórios) e à justeza (efeitos sistemáticos). Estes valores foram obtidos de acordo com as expressões anteriormente apresentadas (18 a 24) (valores em percentagem) e tendo em conta as leituras de MRC efetuadas durante o processo de validação do método.

Foi ainda calculada a incerteza de medição máxima (Uf) (relativizada e expandida) para se poder verificar a adequabilidade do método, através da comparação desse valor com a incerteza-expandida obtida. A Uf foi calculada de acordo com a Equação 3.

Tabela 15 – Estimativa da incerteza associada à quantificação do Mn por ICP-MS.

$u_{R_w,rel}$	4,2%
$u_{b,rel}$	4,5%
$u_{c,rel}$	6,1%
U_{rel}	13,2%
Uf	20,0%

Neste trabalho apenas se procedeu à estimativa da incerteza utilizando um MRC e como tal, a incerteza poderá estar subestimada. Como trabalho futuro, será importante, re-estimar a incerteza, se possível, a partir de outro MRC, de preferência com uma concentração de Mn mais próxima dos valores existentes no peixe, ou a partir de ensaios de comparação

interlaboratorial. Esta estimativa foi obtida com um número considerável de leituras de MRC, lidos em condições de precisão intermédia, sendo que as componentes associadas à justeza e à precisão foram representativas, dentro do nível de concentração do MRC. Sendo assim, seria importante que o LCA, no futuro, reavaliasse esta estimativa.

A incerteza-expandida (U), expressa na forma de incerteza-padrão relativa estimada para a quantificação de Mn em peixe por ICP-MS foi de 13,2%. A incerteza de medição máxima (U_f) obtida (relativizada e expandida) foi de 20,0% e como tal, o método demonstrou-se adequado, uma vez que a incerteza calculada para o método foi inferior à incerteza de medição máxima.

As incertezas associadas às etapas de quantificação, bem como as incertezas de medição máximas de Sr em peixe, por ICP-MS e Cu, Fe e Zn em peixe, por ICP-OES são apresentadas nas Tabelas 28, 37, 45 e 54, respetivamente. As incertezas-expandidas (U), expressas na forma de incertezas-padrão relativas estimadas para a quantificação de Sr em peixe, por ICP-MS e Cu, Fe e Zn em peixe, por ICP-MS foram respetivamente: 14,9%; 13,6%; 18,8% e 20,0%. As incertezas de medição máximas (U_f) obtidas (relativizadas e expandidas) foram de 20,0% e como tal, os métodos demonstraram-se adequados, uma vez que as incertezas calculadas para os métodos foram inferiores às incertezas de medição máximas.

3.1.7. Resumo da validação dos métodos

No âmbito deste trabalho foi possível fazer a validação da metodologia de quantificação de Mn e Sr por ICP-MS e de Cu, Fe e Zn por ICP-OES para a matriz peixe. Os dados usados para a validação destes métodos podem ser consultados no corpo do documento (Mn) e nos Anexos 6.1 a 6.4 (Sr, Cu, Fe e Zn). O estudo de validação destas metodologias foi executado com base no procedimento de validação de métodos internos de ensaio do LCA (DQ.PSQ.019). As Tabelas 16 a 20 apresentam os parâmetros de desempenho selecionados para cada um dos métodos, bem como os resultados obtidos.

Relativamente à avaliação das interferências de matriz verificou-se que os elementos selecionados não apresentaram interferências de matriz relevantes e apresentaram percentagens de recuperação de acordo com os requisitos estabelecidos pelo LCA (percentagem de recuperação para todos os elementos estudados variou entre 81 e 115%).

As interferências espectrais foram avaliadas para os métodos de quantificação de Cu e Zn, por ICP-OES. Verificou-se que os padrões contendo os possíveis interferentes

originaram concentrações aparentes, para os analitos de interesse, inferiores aos seus LD e, portanto, conclui-se que esses possíveis interferentes não são significativos na quantificação de Cu e Zn, na matriz referida. Para os outros elementos essa avaliação não foi feita, pois não foram encontradas na bibliografia informações sobre interferentes relevantes.

A justeza do método foi avaliada recorrendo ao MRC e o método de quantificação de Cu por ICP-OES foi o que apresentou um erro de justeza menor. Seria importante que no futuro o LCA utilizasse um outro MRC, para reavaliação da justeza dos métodos, que contivesse concentrações dos analitos de interesse mais baixas/mais próximas das encontradas nas amostras de peixe.

A precisão dos métodos foi avaliada recorrendo ao MRC e a amostras de peixe. O que se verificou para a avaliação da precisão utilizando o MRC foi que esta apresentava coeficientes de variação (de repetibilidade e precisão intermédia) baixos, o que pode ser explicado pela homogeneidade deste material e pela gama de concentrações dos analitos (tendencialmente mais elevadas que nas amostras de peixe). A avaliação da precisão utilizando amostras de peixe originou coeficientes de variação mais elevados, pois a gama de concentrações dos analitos era menor e estas amostras eram mais heterogéneas, o que originou maiores diferenças entre réplicas de digestão.

Através da avaliação da incerteza pode fazer-se uma apreciação global do desempenho dos métodos. Para as metodologias validadas no ICP-MS (Mn e Sr) foi realizado um maior número de leituras do MRC e como tal a incerteza foi estimada com um maior número de determinações. A metodologia que apresentou uma menor incerteza foi a da quantificação de Mn (13,2%) por ICP-MS, seguindo-se a da quantificação de Cu (13,6%) por ICP-OES e a da quantificação de Sr cuja metodologia apresentou uma incerteza maior (14,9%). O Fe e o Zn foram os elementos que apresentaram uma maior incerteza, devida tanto a um maior erro de justeza como a uma menor precisão. As incertezas calculadas para as metodologias validadas neste trabalho foram inferiores às incertezas de medição máximas (U_f); assim demonstra-se a adequabilidade dos métodos para o controlo destes elementos.

Os métodos validados possuem características de desempenho que permitem a quantificação destes elementos em peixe por ICP. Os requisitos poderão posteriormente ser reajustados à medida que sejam obtidos mais resultados (atualmente é o histórico de dados é reduzido).

Tabela 16 – Parâmetros de desempenho para a quantificação de Mn em peixe por ICP-MS.

Parâmetros de validação		Mn em peixe por ICP-MS Isótopo de 55 u.m.a.		Observações
		Requisito	Valor obtido	
Seletividade	Interferências de matriz (recuperações)	80-120%	84-113%	Valor mínimo e máximo obtido
	Interferências espetraais	< LD	n.a.	Não foram identificadas possíveis interferências
Quantificação	Coefficiente de correlação (<i>r</i>)	≥ 0,995	0,9999	Valor mínimo obtido
	Sensibilidade/Declive	n.a.	3938 8898	Valores mínimo e máximo obtidos
	Gama de trabalho	n.a.	1-100 µg/L 0,25-25 µg/g	n.a.
	Limite de quantificação (LQ)	n.a.	1 µg/L 0,25 µg/g	Definido com base nos brancos de digestão e validado com o PVLQ
Precisão	Coef. de variação das (das 3 réplicas) da leitura instrumental	≤ 10%	≤ 7%	Valor máximo obtido
	Coef. de variação de repetibilidade	≤ 10%	≤ 4%	Valor máximo, obtido em 10 leituras do PVLQ, em condições de repetibilidade
	Coef. de variação de repetibilidade da digestão (digestão + leitura)	≤ 10%	≤ 10%	Valor máximo obtido na leitura de réplicas de digestão de amostras de peixe
	<i>HORRAT_r</i>	< 2	0,55	Valor máximo obtido
	Avaliação de duplicados (leitura)	≤ 10%	≤ 8%	Valor máximo obtido para a diferença relativa entre duplicados de leitura
	Avaliação de duplicados (digestão + leitura)	≤ 15%	≤ 10%	Valor máximo obtido para a diferença relativa entre duplicados de digestão
	Precisão intermédia	≤ 10 %	≤ 10%	Valor máximo obtido
	<i>HORRAT_{S_I}</i>	< 2	0,56	Valor máximo obtido
Justeza	Material de referência certificado	≤ 15%	≤ 14%	Valor máximo obtido
Incerteza (exatidão)	ISO 11352:2012	< 20% (<i>U_f</i>)	13,2%	Valor obtido usando o MRC TORT-2

Tabela 17 – Parâmetros de desempenho para a quantificação de Sr em peixe por ICP-MS.

Parâmetros de validação		Sr em peixe por ICP-MS Isótopo de 88 u.m.a.		Observações
		Requisito	Valor obtido	
Seletividade	Interferências de matriz (recuperações)	80-120%	81-114%	Valor mínimo e máximo obtido
	Interferências espectrais	< LD	n.a.	Não foram identificadas possíveis interferências
Quantificação	Coefficiente de correlação (<i>r</i>)	≥ 0,995	0,9999	Valor mínimo obtido
	Sensibilidade/Declive	n.a.	4958 10022	Valores mínimo e máximo obtidos
	Gama de trabalho	n.a.	1-100 µg/L 0,25-25 µg/g	n.a.
	Limite de quantificação (LQ)	n.a.	1 µg/L 0,25 µg/g	Definido com base nos brancos de digestão e validado com o PVLQ
Precisão	Coef. de variação das (das 3 réplicas) da leitura instrumental	≤ 10%	≤ 6%	Valor máximo obtido
	Coef. de variação de repetibilidade	≤ 10%	≤ 3%	Valor máximo, obtido em 10 leituras do PVLQ, em condições de repetibilidade
	Coef. de variação de repetibilidade da digestão (digestão + leitura)	≤ 10%	≤ 9%	Valor máximo obtido na leitura de réplicas de digestão de amostras de peixe
	<i>HORRAT_r</i>	< 2	0,69	Valor máximo obtido
	Avaliação de duplicados (leitura)	≤ 10%	≤ 4%	Valor máximo obtido para a diferença relativa entre duplicados de leitura
	Avaliação de duplicados (digestão + leitura)	≤ 15%	≤ 8%	Valor máximo obtido para a diferença relativa entre duplicados de digestão
	Precisão intermédia	≤ 10 %	≤ 10%	Valor máximo obtido
	<i>HORRAT_{S_I}</i>	< 2	0,67	Valor máximo obtido
Justeza	Material de referência certificado	≤ 15%	≤ 14%	Valor máximo obtido
Incerteza (exatidão)	ISO 11352:2012	< 20% (<i>U_f</i>)	14,9%	Valor obtido usando o MRC TORT-2

Tabela 18 – Parâmetros de desempenho para a quantificação de Cu em peixe por ICP-OES.

Parâmetros de validação		Cu em peixe por ICP-OES $\lambda = 324,754 \text{ nm}$		Observações
		Requisito	Valor obtido	
Seletividade	Interferências de matriz (recuperações)	80-120%	90-112%	Valor mínimo e máximo obtido
	Interferências espectrais	< LD	< LD	Padrões interferentes avaliados: Fe (1 mg/L) Ca (40 mg/L)
Quantificação	Coefficiente de correlação (<i>r</i>)	$\geq 0,995$	0,9997	Valor mínimo obtido
	Sensibilidade/Declive	n.a.	64 73	Valores mínimo e máximo obtidos
	Gama de trabalho	n.a.	7-320 $\mu\text{g/L}$ 1,75-80 $\mu\text{g/g}$	n.a.
	Limite de quantificação (LQ)	n.a.	7 $\mu\text{g/L}$ 1,75 $\mu\text{g/g}$	Definido com base nos brancos de digestão e validado com o PVLQ
Precisão	Coef. de variação das (das 3 réplicas) da leitura instrumental	$\leq 10\%$	$\leq 9\%$	Valor máximo obtido
	Coef. de variação de repetibilidade	$\leq 10\%$	2%	Valor obtido em 10 leituras do PVLQ, em condições de repetibilidade
	Coef. de variação de repetibilidade da digestão (digestão + leitura)	$\leq 10\%$	$\leq 8\%$	Valor máximo obtido na leitura de réplicas de digestão de amostras de peixe
	<i>HORRAT</i> _r	< 2	0,56	Valor máximo obtido
	Avaliação de duplicados (leitura)	$\leq 10\%$	$\leq 8\%$	Valor máximo obtido para a diferença relativa entre duplicados de leitura
	Avaliação de duplicados (digestão + leitura)	$\leq 15\%$	$\leq 10\%$	Valor máximo obtido para a diferença relativa entre duplicados de digestão
	Precisão intermédia	$\leq 10\%$	9%	Valor obtido a partir de réplicas de digestão do MRC
	<i>HORRAT</i> _{S_I}	< 2	0,93	Valor obtido
Justeza	Material de referência certificado	$\leq 15\%$	$\leq 9\%$	Valor máximo obtido
Incerteza (exatidão)	ISO 11352:2012	< 20% (<i>U_f</i>)	13,6%	Valor obtido usando o MRC TORT-2

Tabela 19 – Parâmetros de desempenho para a quantificação de Fe em peixe por ICP-OES.

Parâmetros de validação		Fe em peixe por ICP-OES $\lambda = 259,940 \text{ nm}$		Observações
		Requisito	Valor obtido	
Seletividade	Interferências de matriz (recuperações)	80-120%	85-112%	Valor mínimo e máximo obtido
	Interferências espectrais	< LD	n.a.	Não foram identificadas possíveis interferências
Quantificação	Coeficiente de correlação (r)	$\geq 0,995$	0,9993	Valor mínimo obtido
	Sensibilidade/Declive	n.a.	98 113	Valores mínimo e máximo obtidos
	Gama de trabalho	n.a.	8-800 $\mu\text{g/L}$ 2-200 $\mu\text{g/g}$	n.a.
	Limite de quantificação (LQ)	n.a.	8 $\mu\text{g/L}$ 2 $\mu\text{g/g}$	Definido com base nos brancos de digestão e validado com o PVLQ
Precisão	Coef. de variação das (das 3 réplicas) da leitura instrumental	$\leq 10\%$	$\leq 10\%$	Valor máximo obtido
	Coef. de variação de repetibilidade	$\leq 10\%$	$\leq 2\%$	Valor obtido em 10 leituras do PVLQ, em condições de repetibilidade
	Coef. de variação de repetibilidade da digestão (digestão + leitura)	$\leq 10\%$	$\leq 10\%$	Valor máximo obtido na leitura de réplicas de digestão de amostras de peixe
	$HORRAT_r$	< 2	1,04	Valor máximo obtido
	Avaliação de duplicados (leitura)	$\leq 10\%$	$\leq 8\%$	Valor máximo obtido para a diferença relativa entre duplicados de leitura
	Avaliação de duplicados (digestão + leitura)	$\leq 15\%$	$\leq 13\%$	Valor máximo obtido para a diferença relativa entre duplicados de digestão
	Precisão intermédia	$\leq 10\%$	5%	Valor obtido a partir de réplicas de digestão do MRC
	$HORRAT_{S_I}$	< 2	0,65	Valor obtido
Justeza	Material de referência certificado	$\leq 15\%$	$\leq 12\%$	Valor máximo obtido
Incerteza (exatidão)	ISO 11352:2012	< 20% (U_f)	18,8%	Valor obtido usando o MRC TORT-2

Tabela 20 – Parâmetros de desempenho para a quantificação de Zn em peixe por ICP-OES.

Parâmetros de validação		Zn em peixe por ICP-OES $\lambda = 213,857 \text{ nm}$		Observações
		Requisito	Valor obtido	
Seletividade	Interferências de matriz (recuperações)	80-120%	82 - 115%	Valor mínimo e máximo obtido
	Interferências espectrais	< LD	< LD	Padrões interferentes avaliados: Cu (1 mg/L) Fe (1 mg/L)
Quantificação	Coefficiente de correlação (r)	$\geq 0,995$	0,9996	Valor mínimo obtido
	Sensibilidade/Declive	n.a.	45 51	Valores mínimo e máximo obtidos
	Gama de trabalho	n.a.	12-320 $\mu\text{g/L}$ 3-80 $\mu\text{g/g}$	n.a.
	Limite de quantificação (LQ)	n.a.	12 $\mu\text{g/L}$ 3 $\mu\text{g/g}$	Definido com base nos brancos de digestão e validado com o PVLQ
Precisão	Coef. de variação das (das 3 réplicas) da leitura instrumental	$\leq 10\%$	$\leq 7\%$	Valor máximo obtido
	Coef. de variação de repetibilidade	$\leq 10\%$	4%	Valor obtido em 10 leituras do PVLQ, em condições de repetibilidade
	Coef. de variação de repetibilidade da digestão (digestão + leitura)	$\leq 10\%$	$\leq 10\%$	Valor máximo obtido na leitura de réplicas de digestão de amostras de peixe
	$HORRAT_r$	< 2	0,99	Valor máximo obtido
	Avaliação de duplicados (leitura)	$\leq 10\%$	$\leq 8\%$	Valor máximo obtido para a diferença relativa entre duplicados de leitura
	Avaliação de duplicados (digestão + leitura)	$\leq 15\%$	$\leq 11\%$	Valor máximo obtido para a diferença relativa entre duplicados de digestão
	Precisão intermédia	$\leq 10\%$	7%	Valor obtido a partir de réplicas de digestão do MRC
	$HORRAT_{S_I}$	< 2	0,95	Valor obtido
Justeza	Material de referência certificado	$\leq 15\%$	$\leq 15\%$	Valor máximo obtido
Incerteza (exatidão)	ISO 11352:2012	< 20% (U_f)	19,7%	Valor obtido usando o MRC TORT-2

4. Conclusões

O trabalho de estágio foi realizado no Laboratório Central de Análises da Universidade de Aveiro e teve por principal objetivo o desenvolvimento e validação de uma metodologia para análise de elementos essenciais e potencialmente tóxicos em peixe, usando técnicas de análise multi-elementar tais como ICP-MS e ICP-OES. A validação destas metodologias tem como finalidade a sua posterior acreditação. O LCA é um laboratório acreditado pelo IPAC para a análise elementar nas matrizes água e solos.

Neste trabalho foram validadas as metodologias de quantificação de Mn e Sr por ICP-MS e Cu, Fe e Zn por ICP-OES para a matriz peixe. Para os métodos poderem ser acreditados será necessário que o LCA participe com sucesso num ensaio de comparação interlaboratorial para a análise destes elementos em peixe, uma vez que este é um requisito obrigatório da acreditação.

O trabalho desenvolvido no âmbito deste estágio permitiu adquirir experiência e desenvolver competências relacionadas com as práticas de controlo e garantias da qualidade e validação de métodos analíticos, assim como ter algum contacto com técnicas instrumentais de análise por ICP-MS e ICP-OES.

5. Referências

- Abadi, D.R.V., Dobaradaran, S., Nabipour, I., Lamani, X., Ravanipour, M., Tahmasebi, R., Nazmara, S., 2015. Comparative investigation of heavy metal, trace, and macro element contents in commercially valuable fish species harvested off from the Persian Gulf. *Environmental science and pollution research international* 22, 6670–6678.
- Aceto, M., Abollino, O., Bruzzoniti, M.C., Mentasti, E., Sarzanini, C., Malandrino, M., 2002. Determination of metals in wine with atomic spectroscopy (F-AAS, GF-AAS and ICP-AES); a review. *Food additives and contaminants* 19, 126–133.
- Agah, H., Leermakers, M., Elskens, M., Fatemi, S.M.R., Baeyens, W., 2007. Total Mercury and Methyl Mercury Concentrations in Fish from the Persian Gulf and the Caspian Sea. *Water, Air, & Soil Pollution* 181, 95–105.
- Akinyele, I.O., Shokunbi, O.S., 2015. Comparative analysis of dry ashing and wet digestion methods for the determination of trace and heavy metals in food samples. *Food Chemistry* 173, 682–684.
- Andayesh, S., Hadiani, M.R., Mousavi, Z., Shoeibi, S., 2015. Lead, cadmium, arsenic and mercury in canned tuna fish marketed in Tehran, Iran. *Food Additives & Contaminants: Part B* 8, 93–98.
- Antes, F.G., Duarte, F.A., Mesko, M.F., Nunes, M.A.G., Pereira, V.A., Müller, E.I., Dressler, V.L., Flores, E.M.M., 2010. Determination of toxic elements in coal by ICP-MS after digestion using microwave-induced combustion. *Talanta* 83, 364–369.
- ANVISA, 2013. *Dário Oficial da União*. *Dário Oficial da União* 168, 1–3.
- ASAE, 2012. *Pescado. Riscos e Alimentos* 1–38.
- Ates, A., Türkmen, M., Tepe, Y., 2015. Assessment of heavy metals in Fourteen Marine Fish Species of Four Turkish Seas. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences* 1–7.
- Augood, C., Chakravarthy, U., Young, I., Vioque, J., de Jong, P.T., Bentham, G., Rahu, M., Seland, J., Soubrane, G., Tomazzoli, L., Topouzis, F., Vingerling, J.R., Fletcher, A.E., 2008. Oily fish consumption, dietary docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid intakes, and associations with neovascular age-related macular degeneration. *The American Journal of Clinical Nutrition* 88, 398–406.
- Australian Government, 2004. *What's so healthy about seafood? - a guide for seafood marketers*.
- Bäärnhielm, M., Olsson, T., Alfredsson, L., 2014. Fatty fish intake is associated with decreased occurrence of multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal* 20, 726–732.
- Burlingame, B., 2001. Analysing the Total Diet. *Journal of Food Composition and Analysis* 14, 451–452.
- Burlingame, B., Pineiro, M., 2007. The essential balance: Risks and benefits in food safety and quality. *Journal of Food Composition and Analysis* 20, 139–146.
- Buscemi, S., Nicolucci, A., Lucisano, G., Galvano, F., Grosso, G., Belmonte, S., Sprini, D., Migliaccio, S., Cianferotti, L., Brandi, M.L., Rini, G.B., 2014. Habitual fish intake and clinically silent carotid atherosclerosis. *Nutrition Journal* 13, 1–8.
- Careri, M., Bianchi, F., Corradini, C., 2002. Recent advances in the application of mass spectrometry in food-related analysis. *Journal of Chromatography A* 970, 3–64.
- Cazes, J., 2005. *Analytical Instrumentation Handbook*.
- CE, 2016a. *Recomendação (UE) 2016/1111 da comissão de 6 de julho de 2016 sobre a monitorização do níquel nos alimentos*. *Jornal Oficial da União Europeia* 1–2.
- CE, 2016b. *Regulamento (UE) 2016/582 da comissão de 15 de abril de 2016 que altera o Regulamento (CE) N° 333/2007 no que diz respeito à análise do arsénio na forma inorgânica, chumbo e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e a certos critérios de desempenho da aná*. *Jornal Oficial da União Europeia* 1–4.
- CE, 2015a. *Regulamento (UE) 2015/1005 da comissão de 25 de junho de 2015 que altera o Regulamento (CE) N° 1881/2006 no que diz respeito aos teores máximos de chumbo em certos géneros alimentícios*. *Jornal Oficial da União Europeia* 1–5.
- CE, 2015b. *Regulamento (UE) 2015/1006 da comissão de 25 de junho de 2015 que altera o Regulamento (CE) N° 1881/2006 no que diz respeito aos teores máximos de arsénio na forma inorgânica nos géneros alimentícios*. *Jornal Oficial da União Europeia* 1–3.
- CE, 2014. *Regulamento (UE) N° 488/2014 da comissão de 12 de maio de 2014 que altera o Regulamento (CE) N° 1881/2006 no que diz respeito aos teores máximos de cádmio nos géneros alimentícios*. *Jornal Oficial da União Europeia* 1–5.
- CE, 2011a. *Regulamento (UE) N° 420/2011 da comissão de 29 de abril de 2011 que altera o Regulamento (CE) N° 1881/2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios*. *Jornal Oficial da União Europeia* 1–4.
- CE, 2011b. *Regulamento (UE) N° 836/2011 da comissão de 19 de agosto de 2011 que altera o Regulamento*

- (CE) N° 333/2007 que estabelece métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de chumbo, cádmio, mercúrio, estanho na forma inorgânica, 3-MCP. *Jornal Oficial da União Europeia* 1–8.
- CE, 2008. Regulamento (CE) N° 629/2008 da comissão de 2 de Julho de 2008 que altera o Regulamento (CE) N° 1881/2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia* 1–4.
- CE, 2007. Regulamento (CE) N° 333/2007 da comissão de 28 de março de 2007 que estabelece métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de chumbo, cádmio, mercúrio, estanho na forma inorgânica, 3-MCPD e benzo(a)pireno nos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia* 1–14.
- CE, 2006. Regulamento (CE) N° 1881/2006 da comissão de 19 de dezembro de 2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia* 1–20.
- CE, 2002. Decisão da comissão de 12 de agosto de 2002 que dá execução ao disposto na Diretiva 96/23/CE do Conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias* 1–29.
- CE, 1996. Directiva 96/23/CE do Conselho de 29 de Abril de 1996 relativa às medidas de controlo a aplicar a certas substâncias e aos seus resíduos nos animais vivos e respectivos produtos e que revoga as Directivas 85/358/CEE e 85/358/CEE e 86/469/CEE e as Decisões. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias* 1–23.
- Chowdhury, R., Stevens, S., Gorman, D., Pan, A., Warnakula, S., Chowdhury, S., Ward, H., Johnson, L., Crowe, F., Hu, F.B., Franco, O.H., 2012. Association between fish consumption, long chain omega 3 fatty acids, and risk of cerebrovascular disease: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 345, 1–9.
- Christen, W.G., Schaumberg, D.A., Glynn, R.J., Buring, J.E., 2011. Dietary ω -3 Fatty Acid and Fish Intake and Incident Age-related Macular Degeneration in Women. *Archives of ophthalmology* 129, 921–929.
- Codex Alimentarius, 2015. Codex Alimentarius: About Codex [WWW Document]. URL <http://www.codexalimentarius.org/about-codex/en/> (acedido 11.5.15).
- Cohen, J.T., Bellinger, D.C., Connor, W.E., Shaywitz, B.A., 2005. A Quantitative Analysis of Prenatal Intake of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Cognitive Development. *American Journal of Preventive Medicine* 29, 366–374.
- Connor, W.E., 2000. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *The American journal of clinical nutrition* 71, 171S–5S.
- Copat, C., Arena, G., Fiore, M., Ledda, C., Fallico, R., Sciacca, S., Ferrante, M., 2013. Heavy metals concentrations in fish and shellfish from eastern Mediterranean Sea: Consumption advisories. *Food and Chemical Toxicology* 53, 33–37.
- Cundiff, D.K., Lanou, A.J., Nigg, C.R., 2007. Relation of Omega-3 Fatty Acid Intake to Other Dietary Factors Known to Reduce Coronary Heart Disease Risk. *The American journal of cardiology* 1230–1233.
- Dhanakumar, S., Solaraj, G., Mohanraj, R., 2015. Heavy metal partitioning in sediments and bioaccumulation in commercial fish species of three major reservoirs of river Cauvery delta region, India. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 113, 145–151.
- Di Giuseppe, D., Crippa, A., Orsini, N., Wolk, A., 2014. Fish consumption and risk of rheumatoid arthritis: a dose-response meta-analysis. *Arthritis Research & Therapy* 16, 2–7.
- Djoussé, L., Akinkuolie, A.O., Wu, J.H.Y., Ding, E.L., Gaziano, J.M., 2012. Fish consumption, omega-3 fatty acids and risk of heart failure: A meta-analysis. *Clinical Nutrition* 31, 846–853.
- Dressler, V.L., Antes, F.G., Moreira, C.M., Pozebon, D., Duarte, F.A., 2011. As, Hg, I, Sb, Se and Sn speciation in body fluids and biological tissues using hyphenated-ICP-MS techniques: A review. *International Journal of Mass Spectrometry* 307, 149–162.
- Dsikowitzky, L., Mengesha, M., Dadebo, E., de Carvalho, C.E.V., Sindern, S., 2013. Assessment of heavy metals in water samples and tissues of edible fish species from Awassa and Koka Rift Valley Lakes, Ethiopia. *Environmental Monitoring and Assessment* 185, 3117–3131.
- Dural, M., Göksu, M.Z.L., Özak, A.A., 2007. Investigation of heavy metal levels in economically important fish species captured from the Tuzla lagoon. *Food Chemistry* 102, 415–421.
- Duran, A., Tuzen, M., Soylak, M., 2014. Assessment of trace metal concentrations in muscle tissue of certain commercially available fish species from Kayseri, Turkey. *Environmental Monitoring and Assessment* 186, 4619–4628.
- Duran, A., Tuzen, M., Soylak, M., 2010. Trace element concentrations of some pet foods commercially available in Turkey. *Food and Chemical Toxicology* 48, 2833–2837.
- EFSA, 2015a. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for magnesium. *EFSA Journal* 13, 1–63.

- EFSA, 2015b. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for calcium. *EFSA Journal* 13, 1–82.
- EFSA, 2015c. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for copper. *EFSA Journal* 13, 1–51.
- EFSA, 2014a. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for chromium. *EFSA Journal* 12, 1–25.
- EFSA, 2014b. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for zinc. *EFSA Journal* 12, 1–76.
- EFSA, 2014c. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for selenium. *EFSA Journal* 12, 1–67.
- EFSA, 2013a. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for manganese. *EFSA Journal* 11, 1–44.
- EFSA, 2013b. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for molybdenum. *EFSA Journal* 11, 1–35.
- EFSA, 2010. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for iron. *EFSA Journal* 13, 1–115.
- Ekino, S., Susa, M., Ninomiya, T., Imamura, K., Kitamura, T., 2007. Minamata disease revisited: An update on the acute and chronic manifestations of methyl mercury poisoning. *Journal of the Neurological Sciences* 262, 131–144.
- EURACHEM, 2014. Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics.
- EURL, 2016a. EURL for Heavy Metals in feed and food [WWW Document]. European Union Reference Laboratory (EURL). URL <https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/heavy-metals/network-laboratories> (acedido 7.12.16).
- EURL, 2016b. EURL for Heavy Metals in feed and food Interlaboratory comparisons [WWW Document]. URL <https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/heavy-metals/interlaboratory-comparisons> (acedido 7.12.16).
- EURL, 2012. Official methods for the determination of heavy metals in feed and food. European Union Reference Laboratory (EURL) - Heavy metals in feed and food 3, 1–3.
- Falandysz, J., Szymczyk, K., Ichihashi, H., Bielawski, L., Gucia, M., Frankowska, A., Yamasaki, S.-I., 2001. ICP/MS and ICP/AES elemental analysis (38 elements) of edible wild mushrooms growing in Poland. *Food Additives and Contaminants* 18, 503–513.
- Fallah, A.A., Zeynali, F., Saei-Dehkordi, S.S., Rahnama, M., Jafari, T., 2011. Seasonal bioaccumulation of toxic trace elements in economically important fish species from the Caspian Sea using GFAAS. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 6, 367–374.
- FAO, 2015a. Nature’s superfood: 10 interesting facts on fish and nutrition [WWW Document]. URL <http://www.fao.org/zhc/detail-events/en/c/334890/> (acedido 12.2.15).
- FAO, 2015b. Fish contaminants [WWW Document]. URL <http://www.fao.org/fishery/topic/14815/en> (acedido 10.25.15).
- FAO, 2014. The State of World Fisheries and Aquaculture.
- FAO, 2010. World review of fisheries and aquaculture.
- FAO, 2005. Composition of fish [WWW Document]. URL <http://www.fao.org/fishery/topic/12318/en> (acedido 10.22.15).
- FAO, 1997a. Garantia da qualidade dos produtos da pesca [WWW Document]. URL <http://www.fao.org/docrep/003/t1768p/T1768P00.HTM> (acedido 11.6.15).
- FAO, 1997b. Agriculture, Food and Nutrition for Africa. A Resource Book for Teachers of Agriculture [WWW Document]. URL <http://www.fao.org/docrep/w0078e/w0078e08.htm> (acedido 12.18.15).
- FAO, 1983. Compilation of legal limits for hazardous substances in fish and fishery product. FAO Library 746, 1–108.
- FAO/WHO, 1992. International conference on nutrition: World Declaration and Plan of Action for Nutrition, em: World Declaration on Nutrition. pp. 1–50.
- Fernandes, A.C., Medeiros, C.O., Bernardo, G.L., Ebone, M.V., Di Pietro, P.F., Assis, M.A.A. de, Vasconcelos, F. de A.G. de, 2012. Benefits and risks of fish consumption for the human health. *Revista de Nutrição* 25, 283–295.
- Fraser, M., Surette, C., Vaillancourt, C., 2013. Fish and seafood availability in markets in the Baie des Chaleurs region, New Brunswick, Canada: A heavy metal contamination baseline study. *Environmental Science and Pollution Research* 20, 761–770.
- Ghanemi, K., Nikpour, Y., Omidvar, O., Maryamabadi, A., 2011. Sulfur-nanoparticle-based method for separation and preconcentration of some heavy metals in marine samples prior to flame atomic absorption spectrometry determination. *Talanta* 85, 763–769.
- Giri, S., Singh, A.K., 2014. Assessment of human health risk for heavy metals in fish and shrimp collected from Subarnarekha river, India. *International Journal of Environmental Health Research* 24, 429–449.
- Gominak, S.C., Stumpf, W.E., 2012. The world epidemic of sleep disorders is linked to vitamin D deficiency. *Medical Hypotheses* 79, 132–135.
- Grembecka, M., Malinowska, E., Szefer, P., 2007. Differentiation of market coffee and its infusions in view of their mineral composition. *Science of the Total Environment* 383, 59–69.
- Grosso, G., Galvano, F., Marventano, S., Malaguarnera, M., Bucolo, C., Drago, F., Caraci, F., 2014. Omega-3

- Fatty Acids and Depression: Scientific Evidence and Biological Mechanisms. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 1–16.
- Gu, Y.-G., Lin, Q., Wang, X.-H., Du, F.-Y., Yu, Z.-L., Huang, H.-H., 2015. Heavy metal concentrations in wild fishes captured from the South China Sea and associated health risks. *Marine Pollution Bulletin* 96, 508–512.
- Hague, T., Petroczi, A., Andrews, P.L., Barker, J., Naughton, D.P., 2008. Determination of metal ion content of beverages and estimation of target hazard quotients: a comparative study. *Chemistry Central journal* 2, 1–9.
- Hallahan, B., Hibbeln, J.R., Davis, J.M., Garland, M.R., 2007. Omega-3 fatty acid supplementation in patients with recurrent self-harm Single-centre double-blind randomised controlled trial. *British Journal of Psychiatry* 190, 118–122.
- Hansen, A.L., Dahl, L., Olson, G., Thornton, D., Graff, I.E., Frøyland, L., Thayer, J.F., Pallesen, S., 2014. Fish Consumption, Sleep, Daily Functioning, and Heart Rate Variability. *Journal of Clinical Sleep Medicine* 10, 567–75.
- Hill, S.J., 2007. Inductively Coupled Plasma Spectrometry and its Applications.
- Hoening, M., 2001. Preparation steps in environmental trace element analysis - Facts and traps. *Talanta* 54, 1021–1038.
- HORIBA Scientific, sem data. Total Multi-line Concept [WWW Document]. URL <http://www.horiba.com/fileadmin/uploads/Scientific/Documents/Emission/activa-m.pdf> (accedido 3.16.16).
- Hosseini, M., Nabavi, S.M.B., Nabavi, S.N., Pour, N.A., 2015. Heavy metals (Cd, Co, Cu, Ni, Pb, Fe, and Hg) content in four fish commonly consumed in Iran: risk assessment for the consumers. *Environmental Monitoring and Assessment* 187.
- Ikem, A., Egiebor, N.O., 2005. Assessment of trace elements in canned fishes (mackerel, tuna, salmon, sardines and herrings) marketed in Georgia and Alabama (United States of America). *Journal of Food Composition and Analysis* 18, 771–787.
- Ikem, A., Nwankwoala, A., Oduyungbo, S., Nyavor, K., Egiebor, N., 2002. Levels of 26 elements in infant formula from USA, UK, and Nigeria by microwave digestion and ICP-OES. *Food Chemistry* 77, 439–447.
- Inorganic Ventures, 2014. ICP Periodic Table Guide.
- IPAC, 2011. Guia para a acreditação de laboratórios químicos OGC002.
- IPAC, 2007. GUIA PARA A QUANTIFICAÇÃO DE INCERTEZA EM ENSAIOS QUÍMICOS OGC007 1–19.
- IPQ, 2012. Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM).
- IPQ, 2005. NP EN ISO/IEC 17025 - Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração.
- Islam, M.S., Ahmed, M.K., Habibullah-Al-Mamun, M., 2015. Determination of Heavy Metals in Fish and Vegetables in Bangladesh and Health Implications. *Human and Ecological Risk Assessment* 21, 986–1006.
- ISO, 2012. ISO 11352 Water quality - Estimation of measurement uncertainty based on validation and quality control data 1–34.
- ISO, 2007. ISO 11885 Water quality - Determination of selected elements by selected elements by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) 2, 1–36.
- ISO, 2004. ISO 17294-1 Water quality - Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) - Part 1 1–38.
- ISO, 2003. ISO 17294-2 Water quality - Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) - Part 2 1–28.
- Iwegbue, C.M.A., 2015. Metal concentrations in selected brands of canned fish in Nigeria: estimation of dietary intakes and target hazard quotients. *Environmental Monitoring and Assessment* 187, 1–15.
- Jarapala, S.R., Kandlakunta, B., Thingnganing, L., 2014. Evaluation of Trace Metal Content by ICP-MS Using Closed Vessel Microwave Digestion in Fresh Water Fish. *Journal of Environmental and Public Health* 2014, 1–8.
- Jebakumar, J.P.P., Nandhagopal, G., Sundradarajan, S., Karuppasamy, M., Ragumaran, S., 2015. Eminence of heavy metal accumulation in fishes and crustaceans from the Gulf of Khambhat, India. *Current Science* 109, 409–413.
- Kim, J.H., Lee, J.Y., Seo, J.E., Jeong, J.Y., Jung, K.K., Yoon, H.J., Park, K.S., 2012. Lead, cadmium and mercury levels in the 2010 Korean diet. *Food Additives and Contaminants: Part B* 5, 260–264.
- Korn, M. das G.A., Morte, E.S. da B., Santos, D.C.M.B. dos, Castro, J.T., Barbosa, J.T.P., Teixeira, A.P., Fernandes, A.P., Welz, B., Santos, W.P.C. dos, Santos, E.B.G.N. dos, Korn, M., 2008. Sample

- Preparation for the Determination of Metals in Food Samples Using Spectroanalytical Methods - A Review. *Applied Spectroscopy Reviews* 43, 67–92.
- Kris-Etherton, P.M., Harris, W.S., Appel, L.J., 2002. Fish Consumption, Fish Oil, Omega-3 Fatty Acids, and Cardiovascular Disease. *Circulation* 106, 2747–2757.
- Leblanc, J.-C., Guérin, T., Noël, L., Calamassi-Tran, G., Volatier, J.-L., Verger, P., 2005. Dietary exposure estimates of 18 elements from the 1st French Total Diet Study. *Food Additives and Contaminants* 22, 624–641.
- Li, J., Xun, P., Zamora, D., Sood, A., Liu, K., Daviglius, M., Iribarren, C., Jacobs, D., Shikany, J.M., He, K., 2013. Intakes of long-chain omega-3 (n-3) PUFAs and fish in relation to incidence of asthma among American young adults: The CARDIA study. *American Journal of Clinical Nutrition* 97, 181–186.
- Lim, L.S., Mitchell, P., Seddon, J.M., Holz, F.G., Wong, T.Y., 2012. Age-related macular degeneration. *The Lancet* 379, 1728–1738.
- Lin, P.-Y., Su, K.-P., 2007. A Meta-Analytic Review of Double-Blind, Placebo-Controlled Trials of Antidepressant Efficacy of Omega-3 Fatty Acids. *Journal of Clinical Psychiatry* 68, 1056–1061.
- Llobet, J.M., Falcó, G., Casas, C., Teixidó, A., Domingo, J.L., 2003. Concentrations of Arsenic, Cadmium, Mercury, and Lead in Common Foods and Estimated Daily Intake by Children, Adolescents, Adults, and Seniors of Catalonia, Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 838–842.
- Löfvenborg, J., Andersson, T., Carlsson, P.-O., Dorkhan, M., Groop, L., Martinell, M., Tuomi, T., Wolk, A., Carlsson, S., 2014. Fatty fish consumption and risk of latent autoimmune diabetes in adults. *Nutrition & Diabetes* 4, 1–6.
- Maciel, J. V., Knorr, C.L., Flores, E.M.M., Müller, E.I., Mesko, M.F., Primel, E.G., Duarte, F.A., 2014. Feasibility of microwave-induced combustion for trace element determination in *Engraulis anchoita* by ICP-MS. *Food Chemistry* 145, 927–931.
- Malesa-Ciećwierz, M., Usydus, Z., 2015. Vitamin D: can fish food-based solutions be used for reduction of vitamin D deficiency in Poland? *Nutrition* 31, 187–92.
- McCann, J.C., Ames, B.N., 2005. Is docosahexaenoic acid, an n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid, required for development of normal brain function? An overview of evidence from cognitive and behavioral tests in humans and animals. *American Journal of Clinical Nutrition* 82, 281–295.
- Medeiros, R.J., dos Santos, L.M.G., Freire, A.S., Santelli, R.E., Braga, A.M.C.B., Krauss, T.M., Jacob, S. do C., 2012. Determination of inorganic trace elements in edible marine fish from Rio de Janeiro State, Brazil. *Food Control* 23, 535–541.
- Menditto, A., Patriarca, M., Magnusson, B., 2006. Understanding the meaning of accuracy, trueness and precision. *Accreditation and Quality Assurance* 1–3.
- Mert, R., Alaş, A., Bulut, S., Özcan, M.M., 2014. Determination of heavy metal contents in some freshwater fishes. *Environmental Monitoring and Assessment* 186, 8017–8022.
- Miedico, O., Iammarino, M., Pompa, C., Tarallo, M., Chiaravalle, A.E., 2015. Assessment of lead, cadmium and mercury in seafood marketed in Puglia and Basilicata (Italy) by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants: Part B* 8, 85–92.
- Milačič, R., Kralj, B., 2003. Determination of Zn, Cu, Cd, Pb, Ni and Cr in some Slovenian foodstuffs. *European Food Research and Technology* 217, 211–214.
- Miller, J., Miller, J.C., 2010. Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry, Technometrics.
- Momen, A.A., Zachariadis, G.A., Anthemidis, A.N., Stratis, J.A., 2007. Use of fractional factorial design for optimization of digestion procedures followed by multi-element determination of essential and non-essential elements in nuts using ICP-OES technique. *Talanta* 71, 443–451.
- Morris, M.C., Evans, D.A., Tangney, C.C., Bienias, J.L., Wilson, R.S., 2005. Fish Consumption and Cognitive Decline With Age in a Large Community Study. *Archives of neurology* 62, 1849–1853.
- Mozaffarian, D., Rimm, E.B., 2006. Fish Intake, Contaminants, and Human Health: Evaluating the Risks and the Benefits. *Jama* 296, 1885–1900.
- Mozaffarian, D., Wu, J.H.Y., 2011. Omega-3 Fatty Acids and Cardiovascular Disease. *Journal of the American College of Cardiology* 58, 2047–2067.
- Murray, J., Burt, J.R., 2001. The Composition of Fish [WWW Document]. FAO. URL <http://www.fao.org/wairdocs/tan/x5916e/x5916e00.htm> (accedido 10.22.15).
- Nardi, E.P., Evangelista, F.S., Tormen, L., Saint Pierre, T.D., Curtius, A.J., Souza, S.S. de, Barbosa, F., 2009. The use of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) for the determination of toxic and essential elements in different types of food samples. *Food Chemistry* 112, 727–732.
- NATA, 2013. Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods.
- Noël, L., Leblanc, J.-C., Guérin, T., 2003. Determination of several elements in duplicate meals from catering establishments using closed vessel microwave digestion with inductively coupled plasma mass

- spectrometry detection: estimation of daily dietary intake. *Food Additives and Contaminants* 20, 44–56.
- Norwegian Scientific Committee for Food Safety (VKM), 2014. Benefit-risk Assessment of Fish and Fish Products in the Norwegian Diet – An Update.
- Peet, M., Horrobin, D.F., 2002. A Dose-Ranging Study of the Effects of Ethyl-Eicosapentaenoate in Patients With Ongoing Depression Despite Apparently Adequate Treatment With Standard Drugs. *Archives of General Psychiatry* 59, 913–919.
- Perugini, M., Visciano, P., Manera, M., Zaccaroni, A., Olivieri, V., Amorena, M., 2014. Heavy metal (As, Cd, Hg, Pb, Cu, Zn, Se) concentrations in muscle and bone of four commercial fish caught in the central Adriatic Sea, Italy. *Environmental Monitoring and Assessment* 186, 2205–2213.
- Pilon, G., Ruzzin, J., Rioux, L.-E., Lavigne, C., White, P.J., Frøyland, L., Jacques, H., Bryl, P., Beaulieu, L., Marette, A., 2011. Differential effects of various fish proteins in altering body weight, adiposity, inflammatory status, and insulin sensitivity in high-fat-fed rats. *Metabolism: clinical and experimental* 60, 1122–1130.
- Rahimi, E., Zaker, S., Farfani, M.D., Araghi, M.R., Vafaei, M., Goudarzi, M., 2012. Cadmium concentrations in shrimp (*Penaeus semisulcatus* and *Penaeus monodon*) caught from the coastal areas in southern Iran. *Toxicology and Industrial Health* 29, 272–275.
- Raji, C.A., Erickson, K.I., Lopez, O.L., Kuller, L.H., Gach, H.M., Thompson, P.M., Riverol, M., Becker, J.T., 2014. Regular Fish Consumption and Age-Related Brain Gray Matter Loss. *American Journal of Preventive Medicine* 47, 444–451.
- RELACRE, 2000. Guia RELACRE - 13 Validação de métodos internos de ensaio em análise química.
- Ruxton, C.H.S., Reed, S.C., Simpson, M.J.A., Millington, K.J., 2004. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. *Journal of Human Nutrition & Dietetics* 17, 449–459.
- Sahan, Y., Basoglu, F., Gücer, S., 2007. ICP-MS analysis of a series of metals (Namely: Mg, Cr, Co, Ni, Fe, Cu, Zn, Sn, Cd and Pb) in black and green olive samples from Bursa, Turkey. *Food Chemistry* 105, 395–399.
- Said, T.O., Omran, A.A., Fawy, K.F., Idris, A.M., 2014. Heavy Metals in Twelve Edible Marine Fish Species From Jizan Fisheries, Saudi Arabia: Monitoring and Assessment. *Fresenius Environmental Bulletin* 23, 801–809.
- SanGiovanni, J.P., Chew, E.Y., Clemons, T.E., Davis, M.D., Ferris, F.L., Gensler, G.R., Kurinij, N., Lindblad, A.S., Milton, R.C., Seddon, J.M., Sperduto, R.D., 2007. The Relationship of Dietary Lipid Intake and Age-Related Macular Degeneration in a Case-Control Study. *Archives of ophthalmology* 125, 671–679.
- Seddon, J.M., George, S., Rosner, B., 2006. Cigarette Smoking, Fish Consumption, Omega-3 Fatty Acid Intake, and Associations With Age-Related Macular Degeneration: The US Twin Study of Age-Related Macular Degeneration. *Archives of ophthalmology* 124, 995–1001.
- Sivaperumal, P., Sankar, T. V., Viswanathan Nair, P.G., 2007. Heavy metal concentrations in fish, shellfish and fish products from internal markets of India vis-a-vis international standards. *Food Chemistry* 102, 612–620.
- Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., Crouch, S.R., 2013. *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 8.^a ed.
- Squadrone, S., Prearo, M., Gavinelli, S., Pellegrino, M., Tarasco, R., Benedetto, A., Abete, M.C., 2013. Heavy metals in *Mugil cephalus* (Mugilidae) from the Ligurian Sea (North-West Mediterranean, Italy). *Food Additives & Contaminants. Part B, Surveillance* 6, 134–138.
- Stene, L.C., Joner, G., 2003. Use of cod liver oil during the first year of life is associated with lower risk of childhood-onset type 1 diabetes: a large, population-based, case-control study. *The American journal of clinical nutrition* 78, 1128–1134.
- Stewart, K.K., 1987. On Reasons for a New Journal. *Journal of Food Composition and Analysis* 1, 1–2.
- Subotić, S., Spasić, S., Višnjić-Jeftić, Ž., Hegediš, A., Krpo-Četković, J., Mićković, B., Skorić, S., Lenhardt, M., 2013. Heavy metal and trace element bioaccumulation in target tissues of four edible fish species from the Danube River (Serbia). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 98, 196–202.
- Supplement Quality, 2004. Minerals - Recommended Daily Intake Levels [WWW Document]. URL http://www.supplementquality.com/news/multi_mineral_chart.html (accedido 12.29.15).
- Sures, B., Taraschewski, H., Hang, C., 1995. Determination of trace metals (Cd, Pb) in fish by electrothermal atomic absorption spectrometry after microwave digestion. *Analytica Chimica Acta* 311, 135–139.
- Taweel, A., Shuhaimi-Othman, M., Ahmad, A.K., 2013. Assessment of heavy metals in tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) from the Langkat River and Engineering Lake in Bangi, Malaysia, and evaluation of the health risk from tilapia consumption. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 93, 45–51.
- Taylor, V.F., Jackson, B.P., Chen, C.Y., 2008. Mercury speciation and total trace element determination of low-biomass biological samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 392, 1283–1290.

- ThermoElemental, 2001. AAS, GFAAS, ICP or ICP-MS ? Which technique should I use ? - An elementary overview of elemental analysis.
- Thomas, R., 2001. A beginner's guide to ICP-MS. *Spectroscopy* 16.
- Thompson, M., 2000. Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing. *Analyst* 125, 385–386.
- Tsai, C.-F., Shih, D.Y.-C., Shyu, Y.-T., 2010. Survey and risk assessment of trace elements in foods from Taiwan containing red mould rice (*Monascus*) by ICP-MS. *Food Additives and Contaminants: Part B* 3, 228–235.
- Tuzen, M., 2009. Toxic and essential trace elemental contents in fish species from the Black Sea, Turkey. *Food and Chemical Toxicology* 47, 1785–1790.
- UA, 2016. LCA [WWW Document]. URL <https://www.ua.pt/lca/> (acedido 6.21.16).
- UA, 2015a. LABORATÓRIO DE ICP-OES E ICP-MS [WWW Document]. URL http://www.ua.pt/lca/infraestrutura_ICP (acedido 6.21.16).
- UA, 2015b. Laboratório Central de Análises da UA passou mais uma etapa LCA já é um laboratório acreditado para análise de qualquer elemento em águas ou solos [WWW Document]. URL <https://uaonline.ua.pt/pub/detail.asp?c=42681> (acedido 6.21.16).
- UA, 2013. Concedida a Acreditação pelo IPAC aos serviços prestados Laboratório Central de Análises da UA reconhecido pelo rigor e qualidade [WWW Document]. URL <https://uaonline.ua.pt/pub/detail.asp?c=33549> (acedido 6.21.16).
- Uysal, K., 2011. Heavy Metal in Edible Portions (Muscle and Skin) and Other Organs (Gill, Liver and Intestine) of Selected Freshwater Fish Species. *International Journal of Food Properties* 14, 280–286.
- Uysal, K., Köse, E., Bülbül, M., Dönmez, M., Erdoğan, Y., Koyun, M., Ömeroğlu, Ç., Özmal, F., 2009. The comparison of heavy metal accumulation ratios of some fish species in Enne Dame Lake (Kütahya/Turkey). *Environmental Monitoring and Assessment* 157, 355–362.
- Vaclavik, V.A., Christian, E.W., 2008. *Essentials of food science*, Third Edit. ed. Springer.
- Velusamy, A., Kumar, P.S., Ram, A., Chinnadurai, S., 2014. Bioaccumulation of heavy metals in commercially important marine fishes from Mumbai Harbor, India. *Marine Pollution Bulletin* 81, 218–224.
- Vessman, J., Stefan, R.I., van Staden, J.F., Danzer, K., Lindner, W., Burns, D.T., Fajgelj, A., Müller, H., 2001. Selectivity in analytical chemistry (IUPAC Recommendations 2001). *Pure and Applied Chemistry* 73, 1381–1386.
- Virtanen, J.K., Mozaffarian, D., Chiuve, S.E., Rimm, E.B., 2008. Fish consumption and risk of major chronic disease in men. *American Journal of Clinical Nutrition* 88, 1618–1625.
- WHO, 2014. WHO | The top 10 causes of death [WWW Document]. URL <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/> (acedido 11.30.15).
- Yang, H., Xun, P., He, K., 2013. Fish and fish oil intake in relation to risk of asthma: a systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE* 8, 1–9.
- Yi, Y., Yang, Z., Zhang, S., 2011. Ecological risk assessment of heavy metals in sediment and human health risk assessment of heavy metals in fishes in the middle and lower reaches of the Yangtze River basin. *Environmental Pollution* 159, 2575–2585.
- Yildirim, Y., Gonulalan, Z., Narin, I., Soylak, M., 2009. Evaluation of trace heavy metal levels of some fish species sold at retail in Kayseri, Turkey. *Environmental Monitoring and Assessment* 149, 223–228.
- Yılmaz, F., Özdemir, N., Demirak, A., Tuna, A.L., 2007. Heavy metal levels in two fish species *Leuciscus cephalus* and *Lepomis gibbosus*. *Food Chemistry* 100, 830–835.
- Zuliani, T., Kralj, B., Stibilj, V., Milačič, R., 2005. Minerals And Trace Elements in Food Commonly Consumed in Slovenia. *Italian Journal of Food Science* 17, 155–167.

6. Anexos

6.1. Validação do método de quantificação de Sr em peixe por ICP-MS

Seletividade

- Testes de recuperação

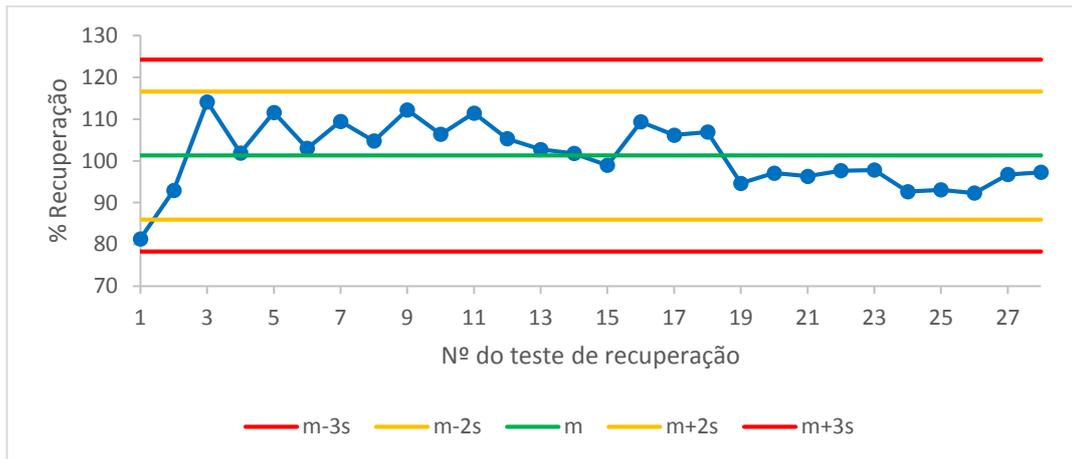


Figura 22 – Carta de controle das percentagens de recuperação de Sr.

Limites de detecção e quantificação

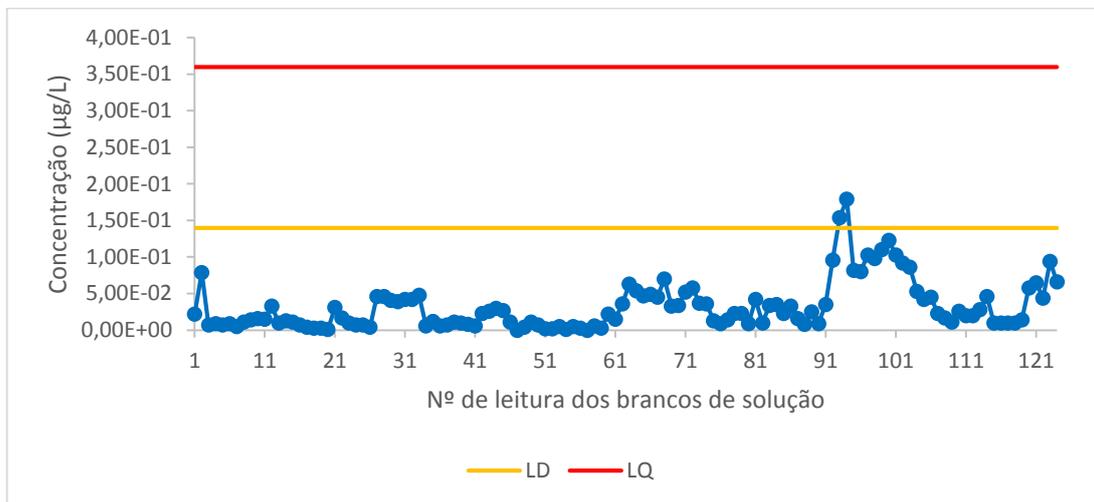


Figura 23 – Carta de verificação dos brancos de solução para o Sr.

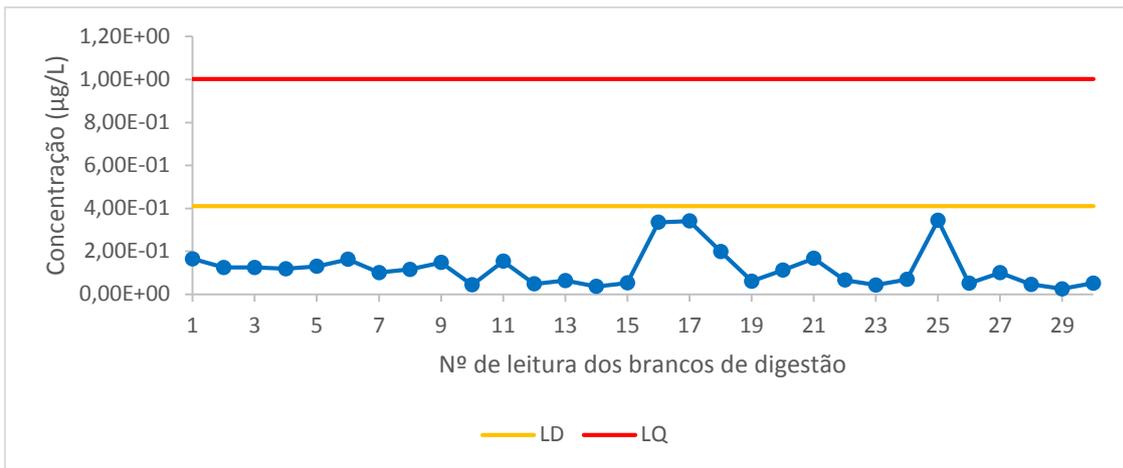


Figura 24 – Carta de verificação dos brancos de digestão para o Sr.

Tabela 21 – Limite de deteção e de quantificação do Sr.

Equação	Branco de solução	Branco de digestão
$LD = \bar{x}_0 + 3,3s_0$	1,40E-01 µg/L	4,11E-01 µg/L (1,03E-01 µg/g)
$LQ = \bar{x}_0 + 10s_0$	3,60E-01 µg/L	1,00E+00 µg/L (2,50E-01 µg/g)

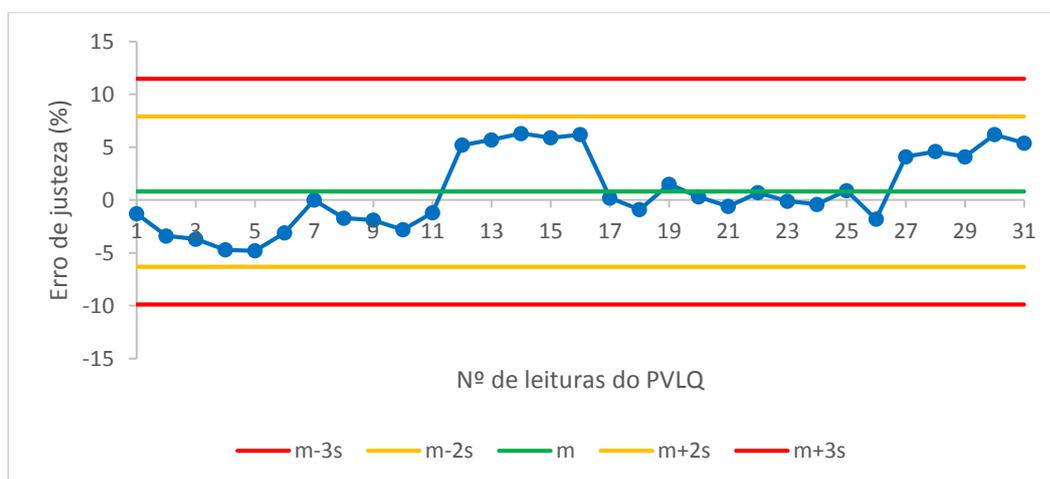


Figura 25 – Carta de controlo do erro de justeza da quantificação de Sr no PVLQ.

Quantificação

Tabela 22 – Valores para a definição da função de calibração linear ponderado do Sr do dia 27/04/2016.

Padrão	Conc. (µg/L)	Média Sinal	si	si ²	1/si ²
P0	0,00	1,82E+02	1,39E+01	1,93E+02	5,19E-03
P0,1	0,10	8,35E+02	3,65E+01	1,33E+03	7,50E-04
P0,5	0,50	3,25E+03	1,06E+02	1,12E+04	8,95E-05
P1	0,98	6,34E+03	1,08E+02	1,17E+04	8,58E-05
P5	4,91	3,12E+04	2,98E+02	8,86E+04	1,13E-05
P10	9,90	6,26E+04	1,05E+03	1,11E+06	9,03E-07
P20	19,59	1,24E+05	1,01E+03	1,02E+06	9,81E-07
P100	98,51	6,24E+05	3,78E+03	1,43E+07	6,99E-08
Soma	134,48	8,52E+05	6,41E+03	1,65E+07	6,13E-03
Média	16,81	1,07E+05	8,01E+02	2,07E+06	7,66E-04

Tabela 23 – Valores para a definição da função de calibração linear ponderado do Sr do dia 27/04/2016

(continuação).

Padrão	Conc. (µg/L)	wi	wi*xi	wi*yi	wi*xi*yi	wi*xi ²
P0	0,00	6,77E+00	0,00E+00	1,23E+03	0,00E+00	0,00E+00
P0,1	0,10	9,79E-01	9,99E-02	8,17E+02	8,34E+01	1,02E-02
P0,5	0,50	1,17E-01	5,78E-02	3,80E+02	1,88E+02	2,86E-02
P1	0,98	1,12E-01	1,10E-01	7,10E+02	6,97E+02	1,08E-01
P5	4,91	1,47E-02	7,23E-02	4,60E+02	2,26E+03	3,55E-01
P10	9,90	1,18E-03	1,17E-02	7,38E+01	7,30E+02	1,16E-01
P20	19,59	1,28E-03	2,51E-02	1,59E+02	3,12E+03	4,92E-01
P100	98,51	9,13E-05	8,99E-03	5,69E+01	5,61E+03	8,85E-01
Soma	134,48	8,00E+00	3,86E-01	3,89E+03	1,27E+04	1,99E+00
Média	16,81	1,00E+00	4,82E-02	4,86E+02	1,59E+03	2,49E-01

Tabela 24 – Valor do erro residual (%) para o Sr nos padrões de calibração.

Padrão	Conc. (µg/L)	Sinal Calculado	Resíduos	Erro residual (%)	[Sr] calculada	Erro relativo (%)
P0	0,00	1,81E+02	7,24E-01	0,40	0,00	-
P0,1	0,10	8,26E+02	8,46E+00	1,01	0,10	1,31
P0,5	0,50	3,31E+03	-6,26E+01	-1,93	0,49	2,00
P1	0,98	6,39E+03	-5,13E+01	-0,81	0,97	0,83
P5	4,91	3,12E+04	-1,99E+01	-0,06	4,90	0,06
P10	9,90	6,28E+04	-2,15E+02	-0,34	9,87	0,34
P20	19,59	1,24E+05	2,81E+02	0,23	19,63	0,23
P100	98,51	6,23E+05	5,90E+02	0,09	98,60	0,09

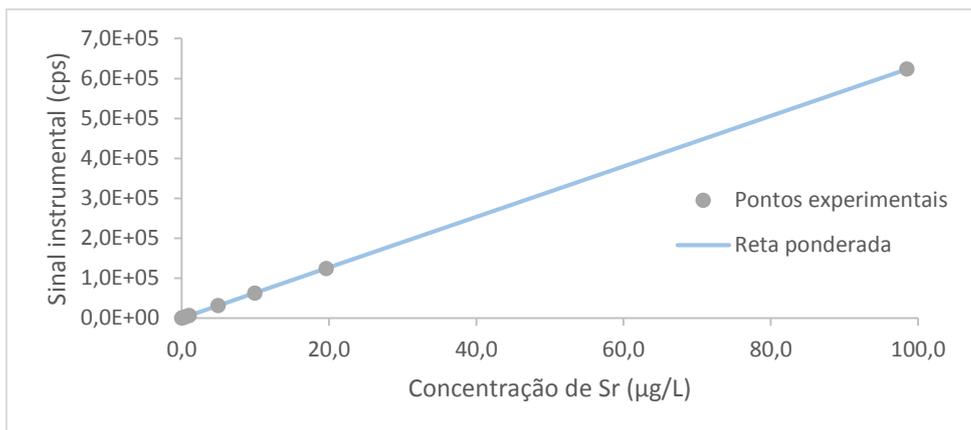


Figura 26 – Função de calibração para a quantificação do Sr no dia 27/04/2016.

Tabela 25 – Parâmetros das funções de calibração obtidas para o Sr.

Data	b_w	a_w (cps)	a_w (µg/L)	r
02/03/2016	7497	42	5,65E-03	0,9999
22/03/2016	7636	268	3,51E-02	0,9999
05/04/2016	4958	86	1,74E-02	0,9999
21/04/2016	7099	139	1,95E-02	0,9999
27/04/2016	6324	181	2,86E-02	1,000
10/05/2016	8621	205	2,38E-02	0,9999
24/05/2016	10022	177	1,76E-02	0,9999

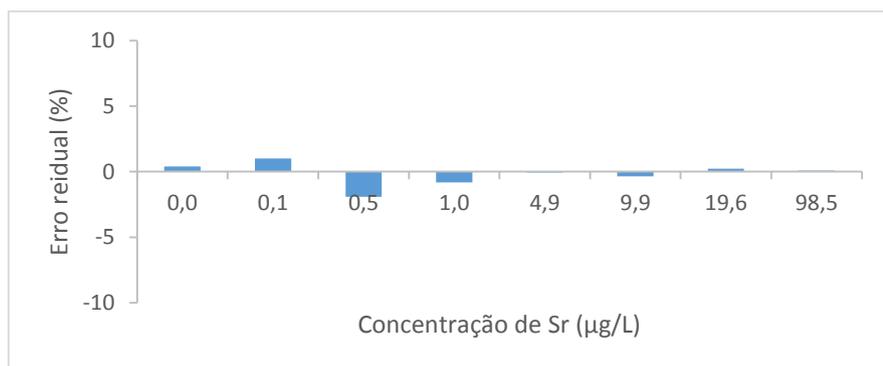


Figura 27 – Erro residual associado aos diferentes padrões de calibração para o Sr, no dia 27/04/2016.

Justeza/veracidade

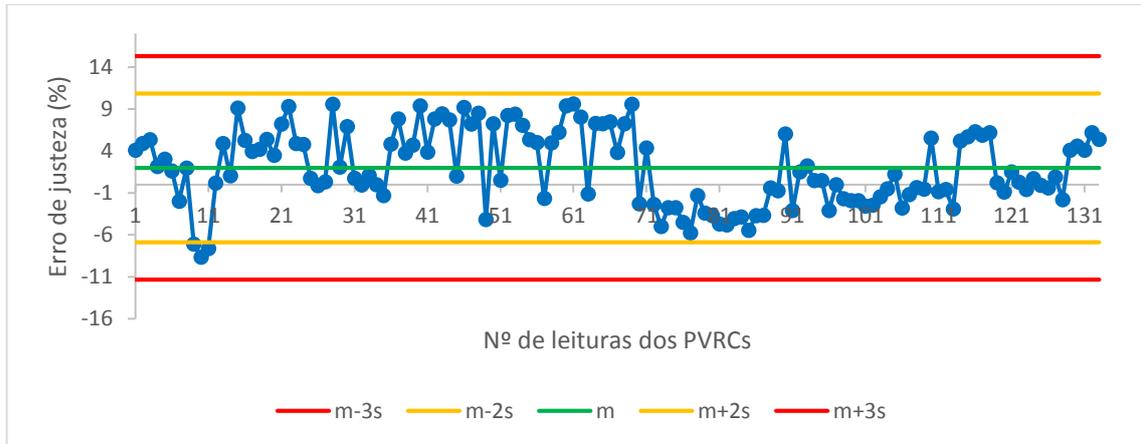


Figura 28 – Carta de controle do erro de justeza na quantificação do Sr nos PVRCs.

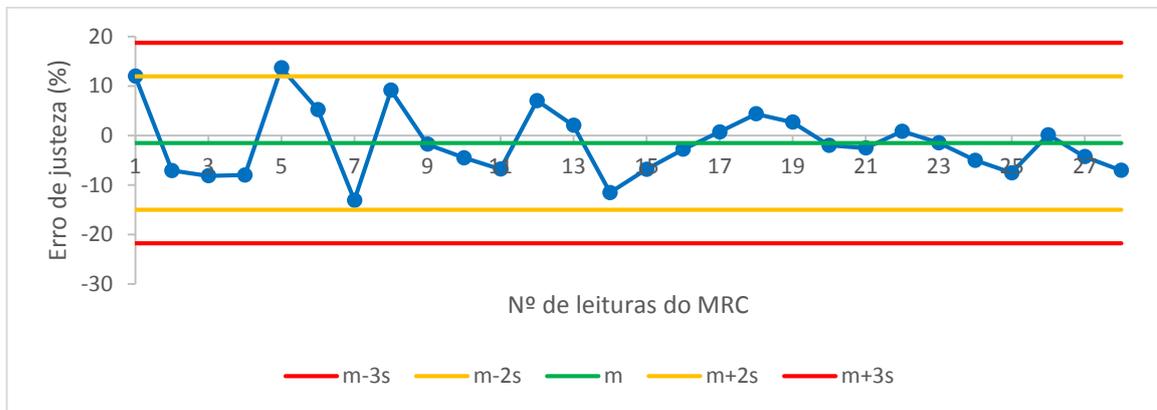


Figura 29 – Carta de controle do erro de justeza na quantificação do Sr no MRC.

Precisão

- **Desvio padrão relativo associado à leitura instrumental**

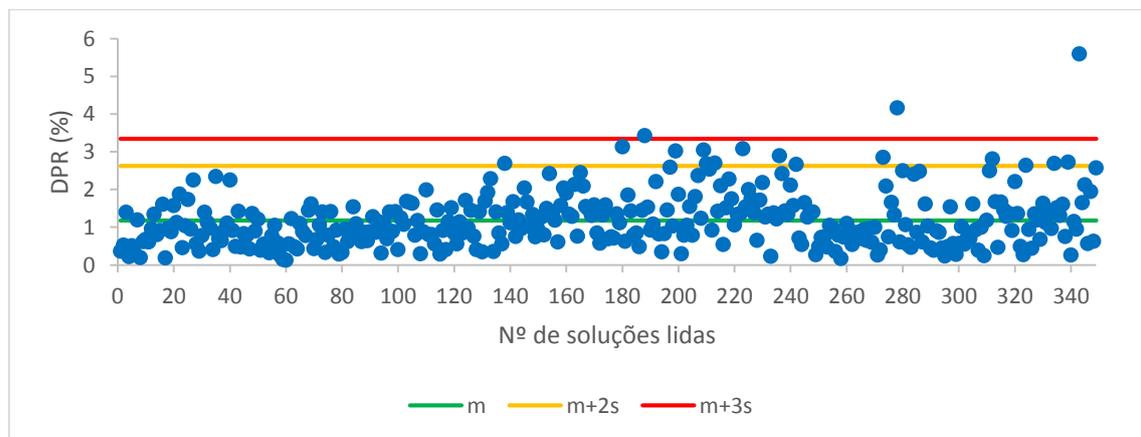


Figura 30 – Carta de controle dos desvios padrões relativos (%) na quantificação do Sr por ICP-MS.

- **Coefficiente de variação de repetibilidade**

Tabela 26 – Valores de $CV_r(\%)$ e de $HORRAT_r$ estimados para o Sr.

Amostras	$CV_r(\%)$	Nº de leituras por amostra	$HORRAT_r$
TORT	6	9	0,69
S. C. G *	9	8	0,62
S. C. G	9	8	0,64
i	8	9	0,61
H	5	10	0,38
S. C. G	9	8	0,66
PVLQ	2	10	
PVLQ	3	10	
PVLQ	3	10	

- **Avaliação de duplicados**

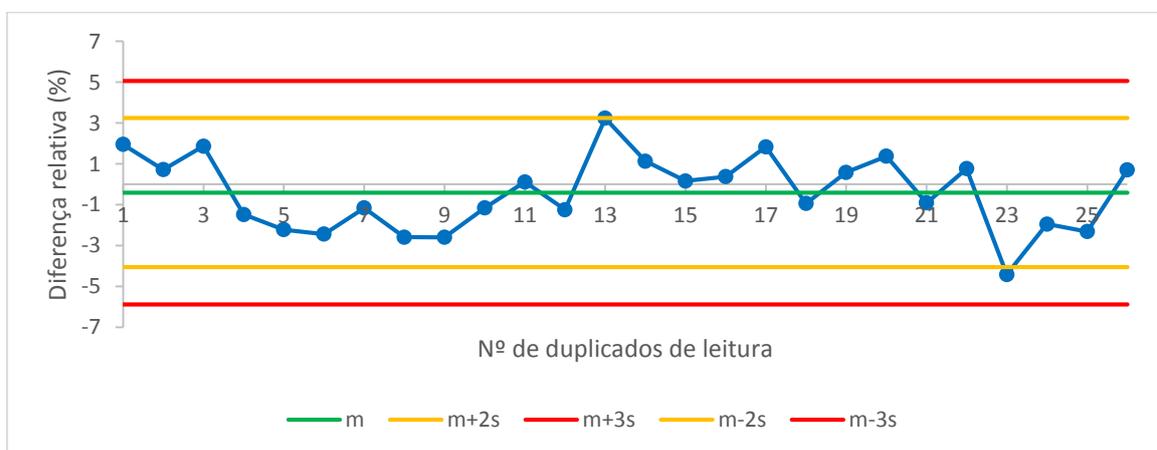


Figura 31 – Carta de controlo para os valores das diferenças relativas (%) dos duplicados de leitura de amostras de peixe.

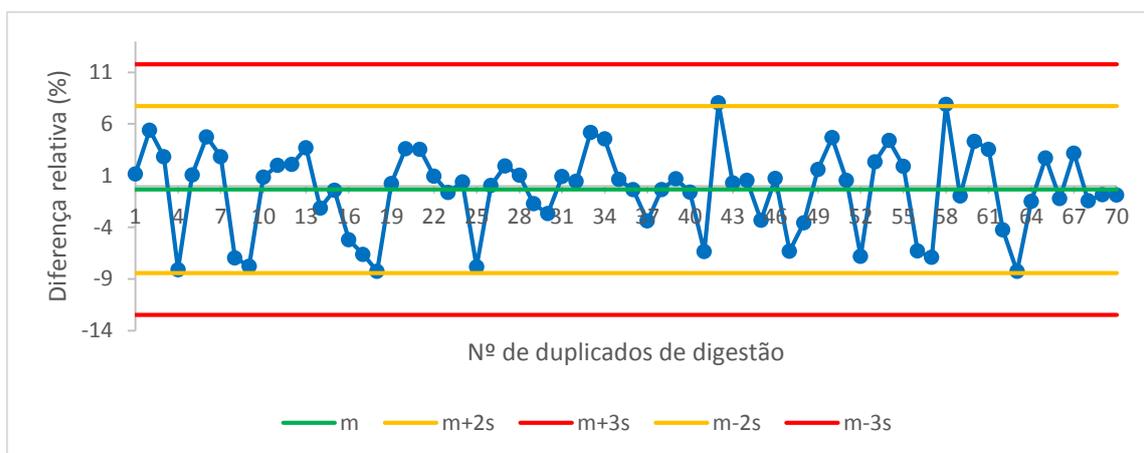


Figura 32 – Carta de controlo para os valores das diferenças relativas (%) dos duplicados de digestão de amostras de peixe.

- **Precisão intermédia**

Tabela 27 – Valores de CV_{S_I} (%) e de $HORRAT_{S_I}$ estimados para o Sr.

Amostras	CV_{S_I} (%)	n	p	$HORRAT_{S_I}$
TORT	4	6	2	0,38
S.C.G	10	8	3	0,67
H	7	5	2	0,48
PVLQ	4	10	3	

Incerteza da medição

Tabela 28 – Estimativa da incerteza associada à quantificação do Sr por ICP-MS.

$u_{R_w,rel}$	5,2 %
$u_{b,rel}$	2,8 %
$u_{c,rel}$	5,9 %
U_{rel}	14,9 %
U_f	20,0 %

6.2. Validação do método de quantificação de Cu em peixe por ICP-OES

Seletividade

- **Testes de recuperação**

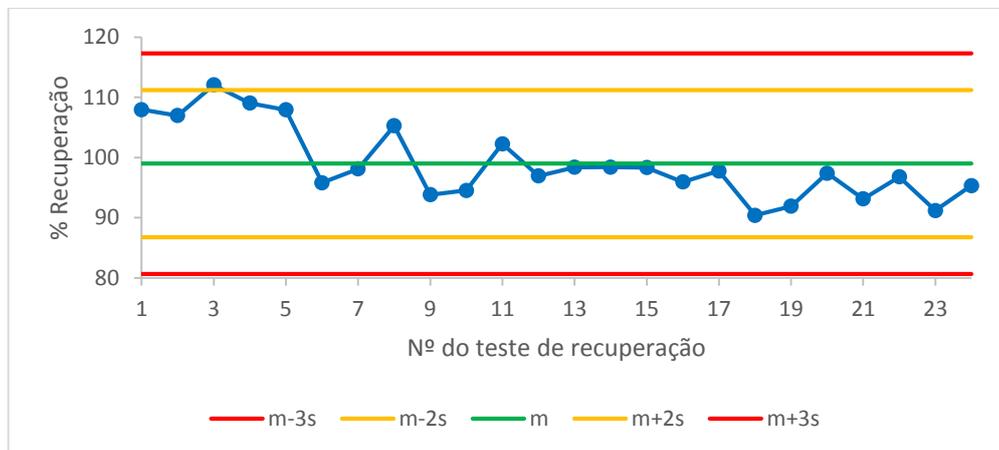


Figura 33 – Carta de controle das percentagens de recuperação de Cu.

- **Interferências espectrais**

Tabela 29 – Valores das leituras efetuadas dos padrões de Fe e Ca para o estudo de interferências espectrais na quantificação de Cu ($\mu\text{g/L}$) por ICP-OES

Avaliação de interferências espectrais na quantificação de Cu ($\mu\text{g/L}$) por ICP-OES	
Fe (1 mg/L)	Ca (40 mg/L)
3,44E-01	2,51E-01
4,31E-01	1,84E-01
1,30E-01	1,98E-01
8,83E-02	2,07E-01
1,32E-01	1,52E-02
1,47E-02	1,74E-01
2,96E-02	1,38E-01
1,55E-01	5,31E-02
7,83E-02	7,60E-02
1,03E-01	1,65E-01

Limites de detecção e quantificação

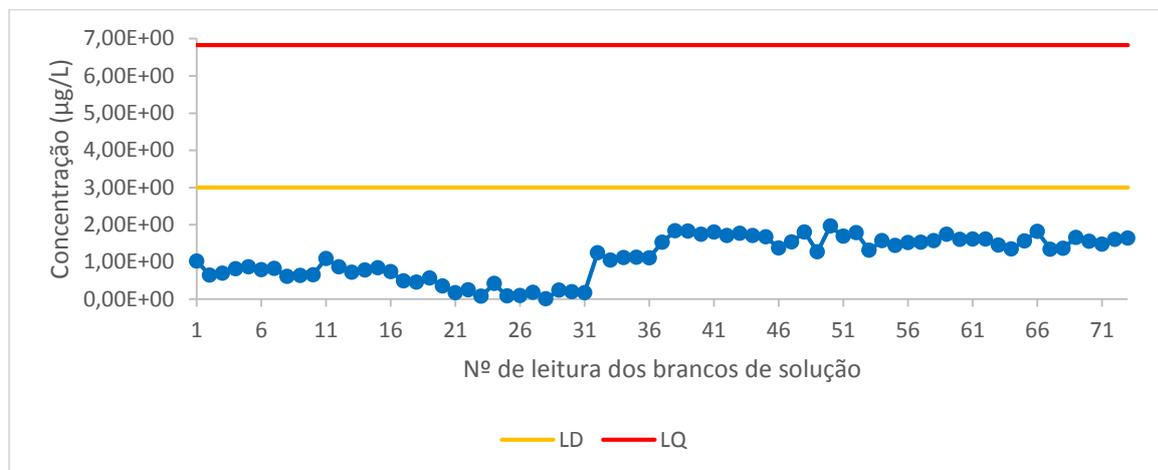


Figura 34 – Carta de verificação dos brancos de solução para o Cu.

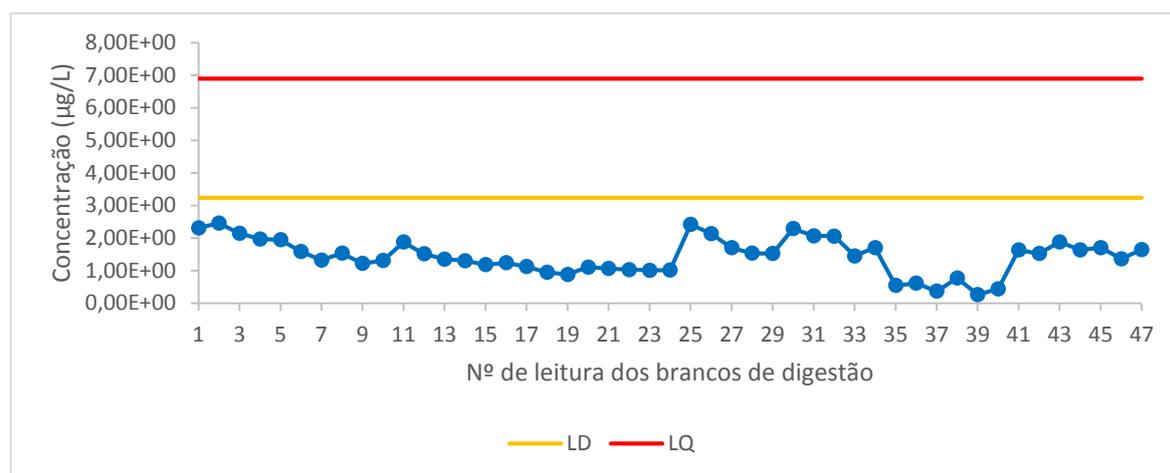


Figura 35 – Carta de verificação dos brancos de digestão para o Cu

Tabela 30 – Limite de detecção e de quantificação do Cu.

Equação	Branco de solução	Branco de digestão
$LD = \bar{x}_0 + 3,3s_0$	3,00E+00 µg/L	3,24E+00 µg/L (8,10E-01 µg/g)
$LQ = \bar{x}_0 + 10s_0$	6,83E+00 µg/L	6,89E+00 µg/L (1,72E+00 µg/g)

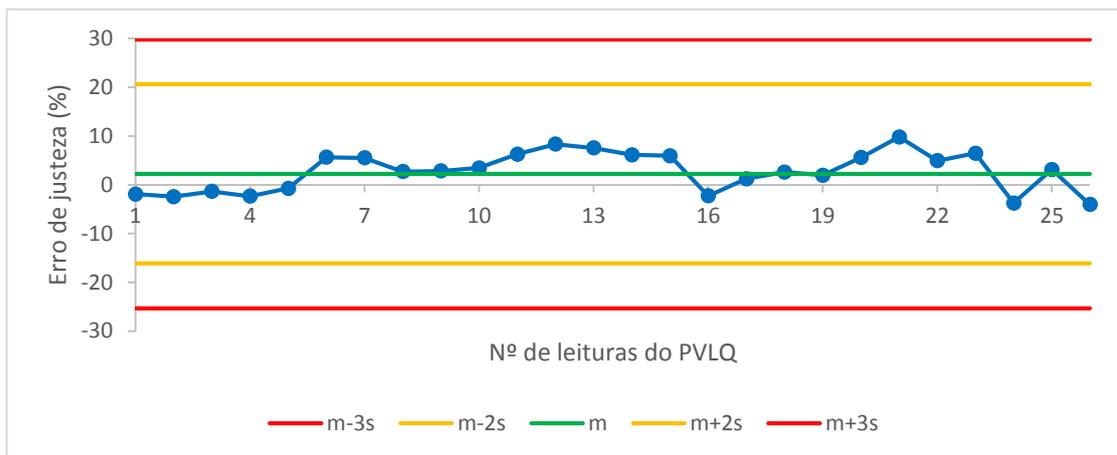


Figura 36 – Carta de controle do erro de justeza da quantificação de Cu no PVLQ.

Quantificação

Tabela 31 – Valores para a definição da função de calibração linear ponderado do Cu do dia 06/04/2016.

Padrão	Conc. (µg/L)	Média Sinal	si	si ²	1/si ²
P0	0,00	2,77E+02	3,41E+01	1,16E+03	8,59E-04
P1	4,00	4,41E+02	1,34E+01	1,80E+02	5,55E-03
P2	8,00	7,13E+02	1,40E+01	1,97E+02	5,08E-03
P3	20,00	1,55E+03	1,76E+01	3,10E+02	3,23E-03
P4	40,00	2,90E+03	7,74E+00	6,00E+01	1,67E-02
P5	80,00	5,84E+03	5,65E+01	3,19E+03	3,14E-04
P6	160,00	1,16E+04	2,07E+02	4,30E+04	2,33E-05
P7	320,00	2,24E+04	1,88E+02	3,55E+04	2,82E-05
Soma	632,00	4,57E+04	5,39E+02	8,35E+04	3,18E-02
Média	79,00	5,71E+03	6,74E+01	1,04E+04	3,97E-03

Tabela 32 – Valores para a definição da função de calibração linear ponderado do Cu do dia 06/04/2016
(continuação).

Padrão	Conc. (µg/L)	wi	wi*xi	wi*yi	wi*xi*yi	wi*xi ²
P0	0,00	2,16E-01	0,00E+00	5,99E+01	0,00E+00	0,00E+00
P1	4,00	1,40E+00	5,59E+00	6,17E+02	2,47E+03	2,24E+01
P2	8,00	1,28E+00	1,02E+01	9,12E+02	7,30E+03	8,19E+01
P3	20,00	8,13E-01	1,63E+01	1,26E+03	2,52E+04	3,25E+02
P4	40,00	4,20E+00	1,68E+02	1,22E+04	4,87E+05	6,72E+03
P5	80,00	7,90E-02	6,32E+00	4,61E+02	3,69E+04	5,05E+02
P6	160,00	5,86E-03	9,38E-01	6,79E+01	1,09E+04	1,50E+02
P7	320,00	7,10E-03	2,27E+00	1,59E+02	5,08E+04	7,27E+02
Soma	632,00	8,00E+00	2,10E+02	1,57E+04	6,20E+05	8,53E+03
Média	79,00	1,00E+00	2,62E+01	1,96E+03	7,76E+04	1,07E+03

Tabela 33 – Valor do erro residual (%) para o Cu nos padrões de calibração.

Padrão	Conc. (µg/L)	Sinal Calculado	Resíduos	Erro residual (%)	[Cu] calculada	Erro relativo (%)
P0	0,00	1,64E+02	1,13E+02	40,89	1,65	-
P1	4,00	4,38E+02	2,97E+00	0,67	4,04	1,1
P2	8,00	7,13E+02	-5,25E-02	-0,01	8,00	0,0
P3	20,00	1,54E+03	1,18E+01	0,76	20,17	0,9
P4	40,00	2,91E+03	-1,35E+01	-0,47	39,80	0,5
P5	80,00	5,66E+03	1,83E+02	3,13	82,66	3,3
P6	160,00	1,12E+04	4,41E+02	3,80	166,42	4,0
P7	320,00	2,21E+04	2,16E+02	0,97	323,15	1,0

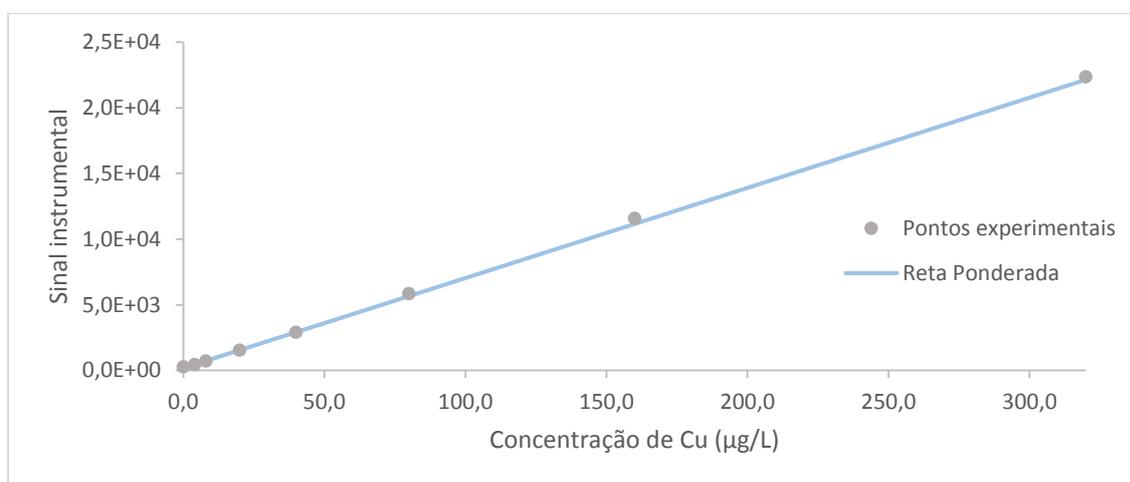


Figura 37 – Função de calibração para a quantificação do Cu no dia 06/04/2016.

Tabela 34 – Parâmetros das funções de calibração obtidas para o Cu.

Data	b_w	a_w	r
11/12/2015	69	222	0,9997
24/02/2016	66	281	0,9999
22/03/2016	64	192	0,9999
06/04/2016	69	164	0,9999
29/04/2016	73	148	0,9998

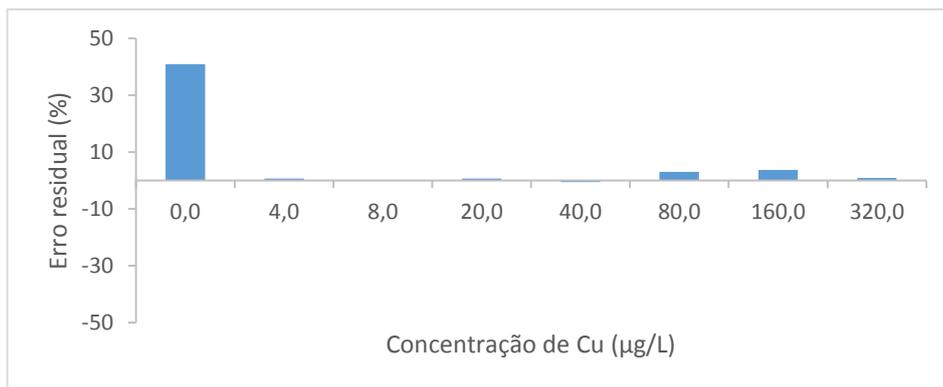


Figura 38 – Erro residual associado aos diferentes padrões de calibração para o Cu, no dia 06/04/2016.

Justeza/veracidade

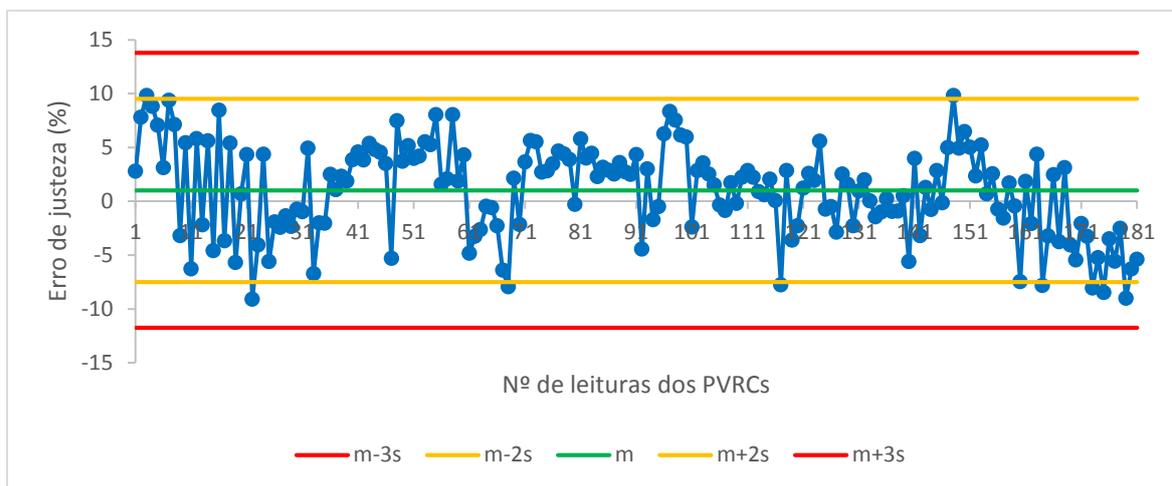


Figura 39 – Carta de controlo do erro de justeza na quantificação do Cu nos PVRCs.

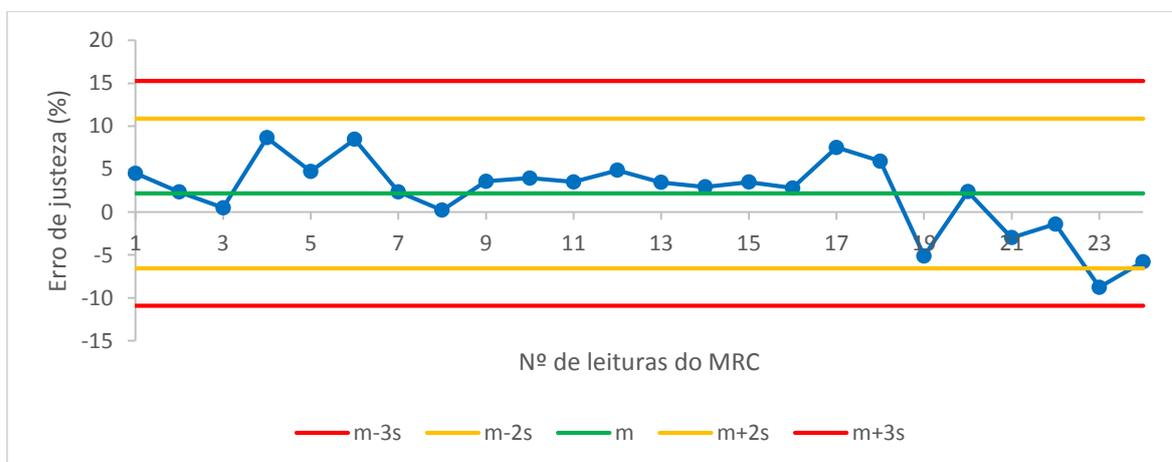


Figura 40 – Carta de controlo do erro de justeza na quantificação do Cu no MRC.

Precisão

- **Desvio padrão relativo associado à leitura instrumental**

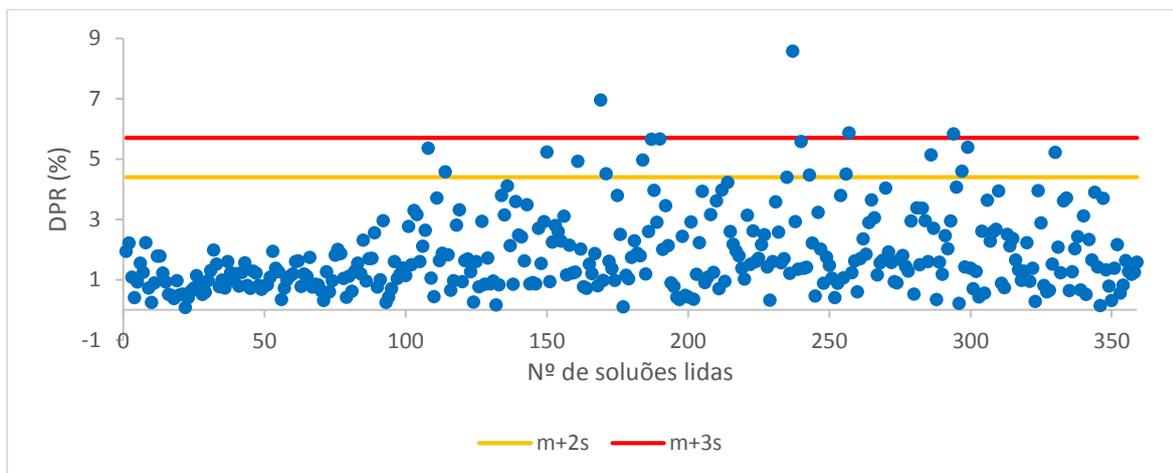


Figura 41 – Carta de controle dos desvios padrões relativos (%) na quantificação do Cu por ICP-OES.

- **Coefficiente de variação de repetibilidade**

Tabela 35 – Valores de $CV_r(\%)$ e de $HORRAT_r$ estimados para o Cu.

Amostras	$CV_r(\%)$	Nº de leituras por amostra	$HORRAT_r$
TORT	1	10	0,15
C.J.F	8	7	0,56
S.C.G	5	9	0,33
PVLQ	2	10	

- **Avaliação de duplicados**

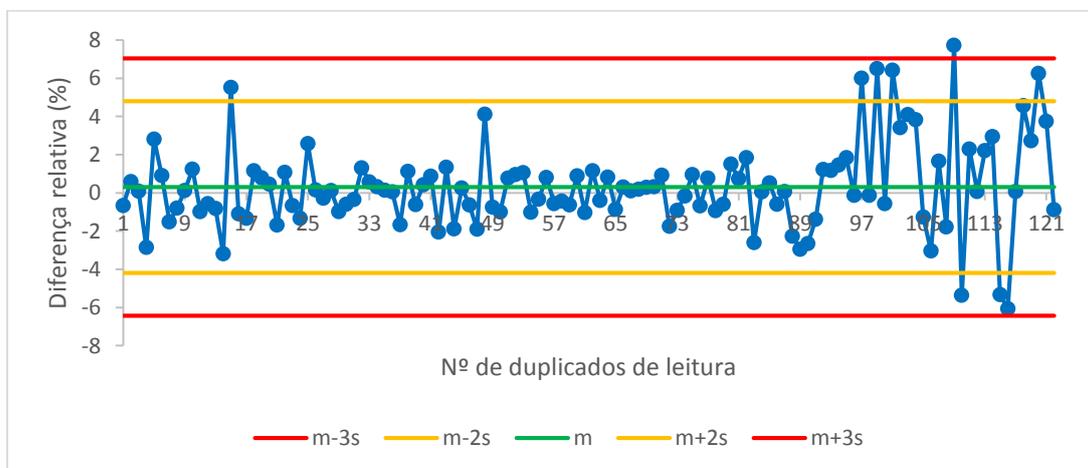


Figura 42 – Carta de controle para os valores das diferenças relativas (%) dos duplicados de leitura de amostras de peixe.

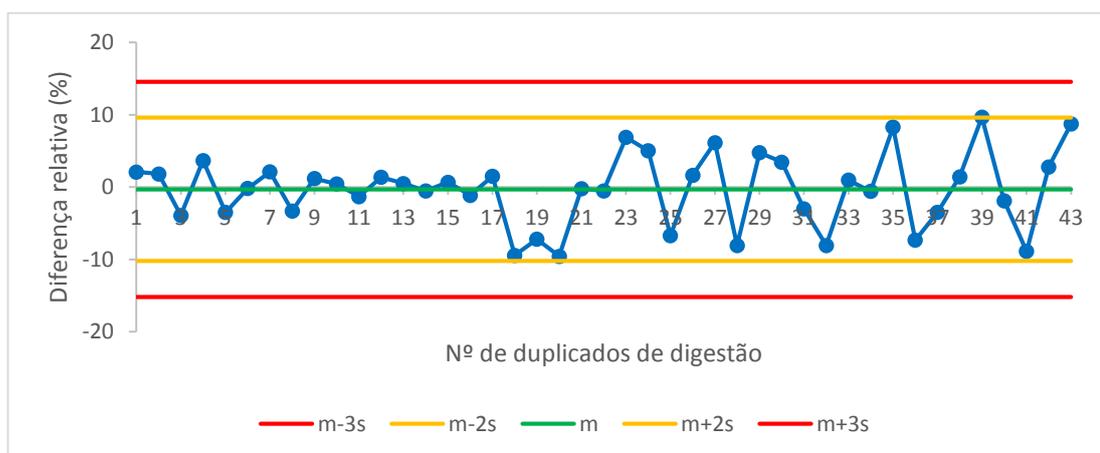


Figura 43 – Carta de controlo para os valores das diferenças relativas (%) dos duplicados de digestão de amostras de peixe.

- **Precisão intermédia**

Tabela 36 – Valores de CV_{S_I} (%) e de $HORRAT_{S_I}$ estimados para o Cu.

Amostras	CV_{S_I} (%)	n	p	$HORRAT_{S_I}$
TORT	9	3	6	0,93
PVLQ	4	5	5	

Incerteza da medição

Tabela 37 – Estimativa da incerteza associada à quantificação do Cu por ICP-OES.

$u_{R_w,rel}$	4,7%
$u_{b,rel}$	5,3%
$u_{c,rel}$	6,8%
U_{rel}	13,6%
U_f	20,0%

6.3. Validação do método de quantificação de Fe em peixe por ICP-OES

Seletividade

- Testes de recuperação

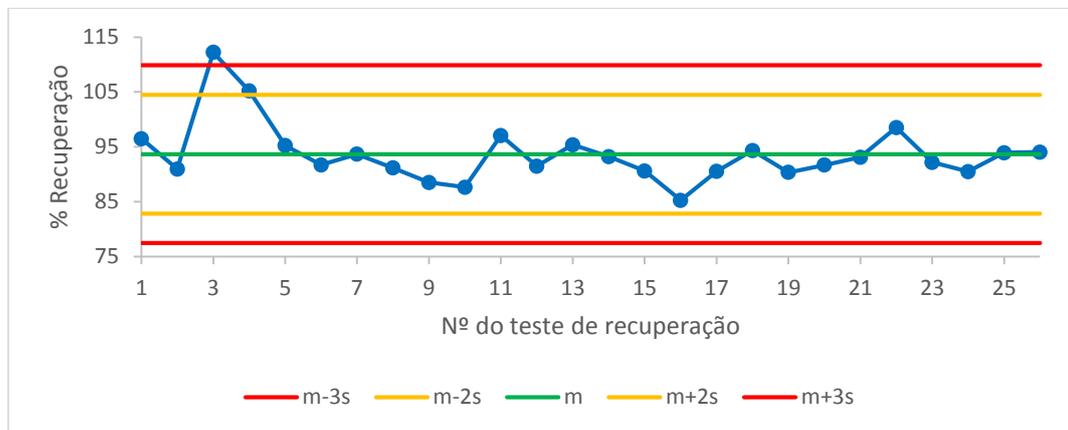


Figura 44 – Carta de controle das percentagens de recuperação de Fe.

Limites de detecção e quantificação

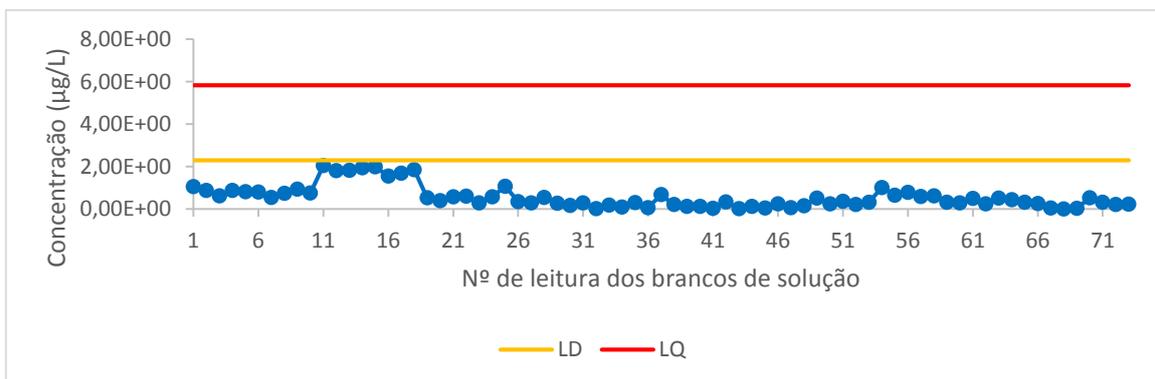


Figura 45 – Carta de verificação dos brancos de solução para o Fe.

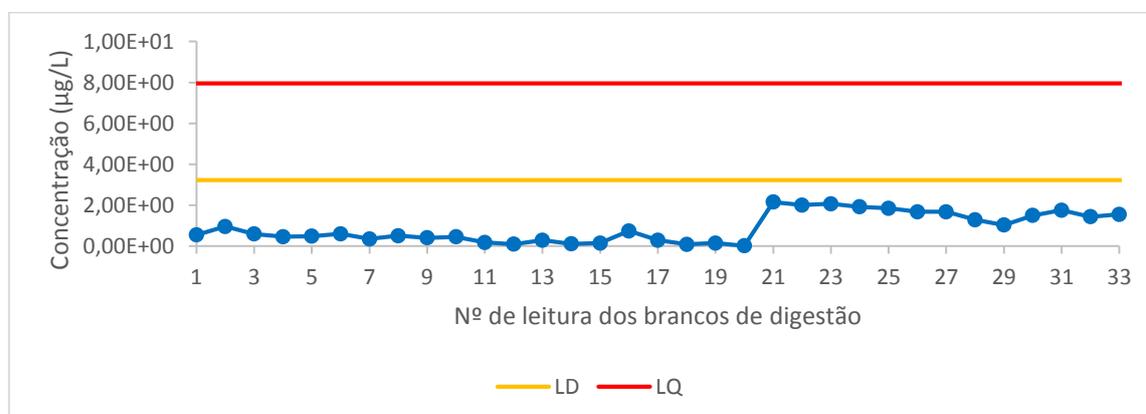


Figura 46 – Carta de verificação dos brancos de solução para o Fe.

Tabela 38 – Limite de detecção e de quantificação do Fe.

Equação	Branco de solução	Branco de digestão
$LD = \bar{x}_0 + 3,3s_0$	2,30E+00 µg/L	3,22E+00 µg/L (8,05E-01 µg/g)
$LQ = \bar{x}_0 + 10s_0$	5,84E+00 µg/L	7,96E+00 µg/L (1,99E+00 µg/g)

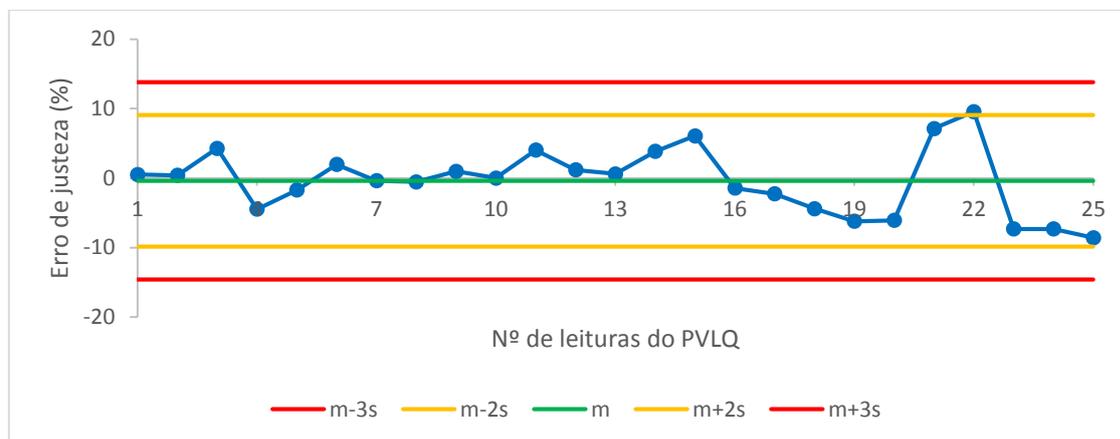


Figura 47 – Carta de controle do erro de justeza da quantificação de Fe no PVLQ.

Quantificação

Tabela 39 – Valores para a definição da função de calibração linear ponderado do Fe do dia 06/04/2016.

Padrão	Conc. (µg/L)	Média Sinal	si	si ²	1/si ²
P0	0,00	1,61E+02	2,96E+01	8,76E+02	1,14E-03
P1	10,00	1,11E+03	4,26E+01	1,81E+03	5,51E-04
P2	20,00	2,13E+03	2,18E+01	4,76E+02	2,10E-03
P3	50,00	5,22E+03	1,36E+02	1,86E+04	5,39E-05
P4	100,00	1,03E+04	2,34E+02	5,46E+04	1,83E-05
P5	200,00	2,06E+04	1,67E+02	2,78E+04	3,60E-05
P6	400,00	4,03E+04	7,56E+01	5,72E+03	1,75E-04
P7	800,00	7,60E+04	6,15E+02	3,78E+05	2,65E-06
Soma	1580,00	1,56E+05	1,32E+03	4,88E+05	4,08E-03
Média	197,50	1,95E+04	1,65E+02	6,10E+04	5,10E-04

Tabela 40 – Valores para a definição da função de calibração linear ponderado do Fe do dia 06/04/2016
(continuação).

Padrão	Conc. (µg/L)	wi	wi*xi	wi*yi	wi*xi*yi	wi*xi ²
P0	0,00	2,24E+00	0,00E+00	3,59E+02	0,00E+00	0,00E+00
P1	10,00	1,08E+00	1,08E+01	1,20E+03	1,20E+04	1,08E+02
P2	20,00	4,12E+00	8,24E+01	8,78E+03	1,76E+05	1,65E+03
P3	50,00	1,06E-01	5,29E+00	5,52E+02	2,76E+04	2,64E+02
P4	100,00	3,59E-02	3,59E+00	3,71E+02	3,71E+04	3,59E+02
P5	200,00	7,06E-02	1,41E+01	1,46E+03	2,91E+05	2,82E+03
P6	400,00	3,43E-01	1,37E+02	1,38E+04	5,52E+06	5,48E+04
P7	800,00	5,19E-03	4,15E+00	3,94E+02	3,16E+05	3,32E+03
Soma	1580,00	8,00E+00	2,57E+02	2,69E+04	6,38E+06	6,34E+04
Média	197,50	1,00E+00	3,22E+01	3,36E+03	7,97E+05	7,92E+03

Tabela 41 – Valor do erro residual (%) para o Fe nos padrões de calibração.

Padrão	Conc. (µg/L)	Sinal Calculado	Resíduos	Erro residual (%)	[Fe] calculada	Erro relativo (%)
P0	0,00	1,43E+02	1,77E+01	11,02	0,18	-
P1	10,00	1,14E+03	-3,45E+01	-3,11	9,66	3,4
P2	20,00	2,14E+03	-1,35E+01	-0,63	19,87	0,7
P3	50,00	5,15E+03	7,18E+01	1,38	50,72	1,4
P4	100,00	1,02E+04	1,80E+02	1,75	101,80	1,8
P5	200,00	2,02E+04	4,63E+02	2,24	204,62	2,3
P6	400,00	4,02E+04	8,27E+01	0,21	400,83	0,2
P7	800,00	8,02E+04	-4,20E+03	-5,52	758,07	5,2

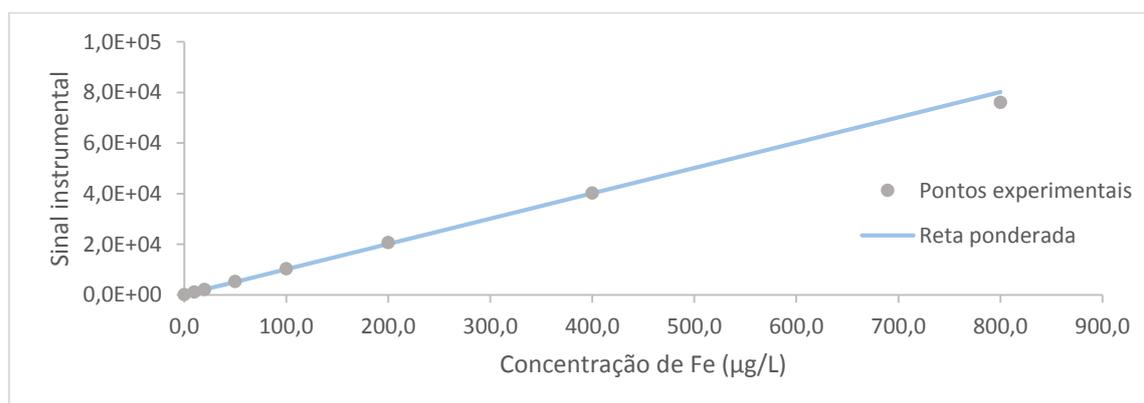


Figura 48 – Função de calibração para a quantificação do Fe no dia 06/04/2016.

Tabela 42 – Parâmetros das funções de calibração obtidas para o Fe.

Data	b_w	a_w	r
11/12/2015	102	118	0,9993
24/02/2016	100	54	0,9998
22/03/2016	98	128	0,9997
06/04/2016	100	143	0,9995
29/04/2016	113	82	0,9995

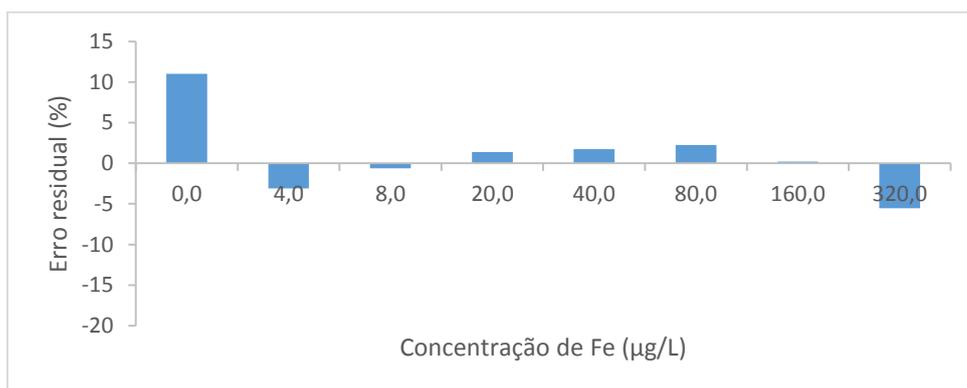


Figura 49 – Erro residual associado aos diferentes padrões de calibração para o Fe, no dia 06/04/2016.

Justeza/veracidade

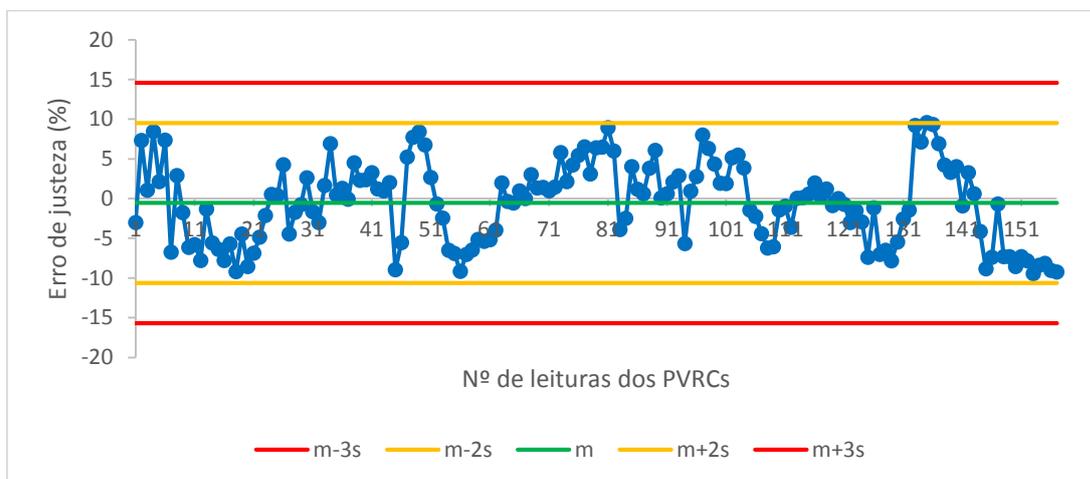


Figura 50 – Carta de controlo do erro de justeza na quantificação do Fe nos PVRCs.

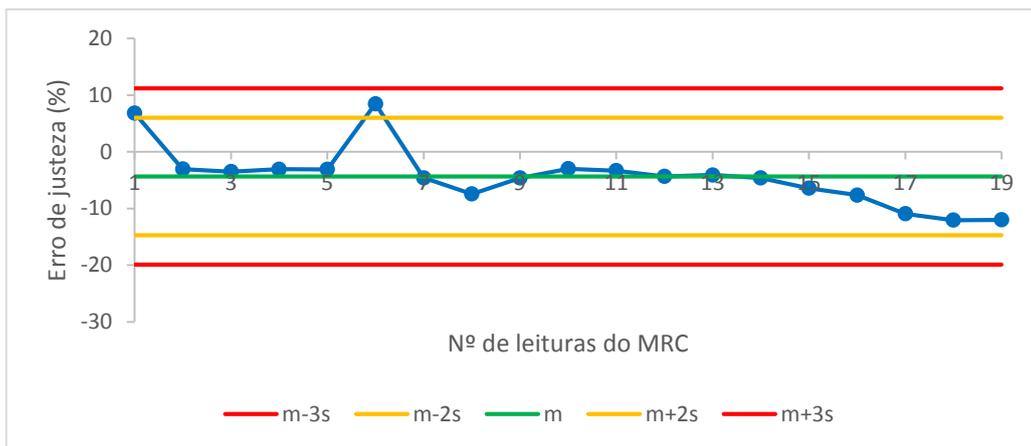


Figura 51 – Carta de controlo do erro de justeza na quantificação do Fe no MRC.

Precisão

- **Desvio padrão relativo associado à leitura instrumental**

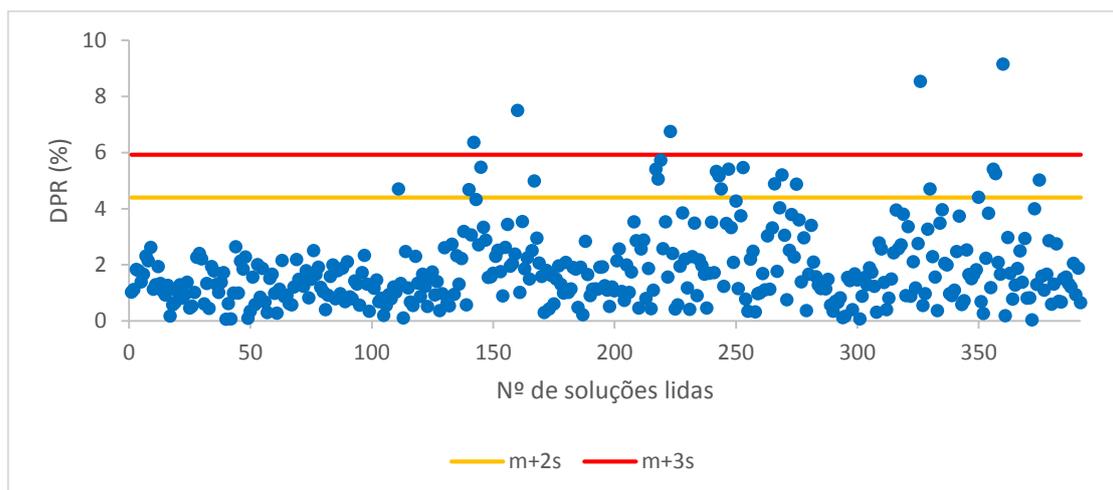


Figura 52 – Carta de controlo dos desvios padrões relativos (%) na quantificação do Fe por ICP-OES.

- **Coefficiente de variação de repetibilidade**

Tabela 43 – Valores de $CV_r(\%)$ e de $HORRAT_r$ estimados para o Fe.

Amostras	$CV_r(\%)$	Nº de leituras por amostra	$HORRAT_r$
TORT	2	10	0,21
C.J.F	10	9	1,04
S.C.G	3	9	0,35
H	10	7	0,71
i	9	10	0,67
PVLQ	2	10	

- **Avaliação de duplicados**

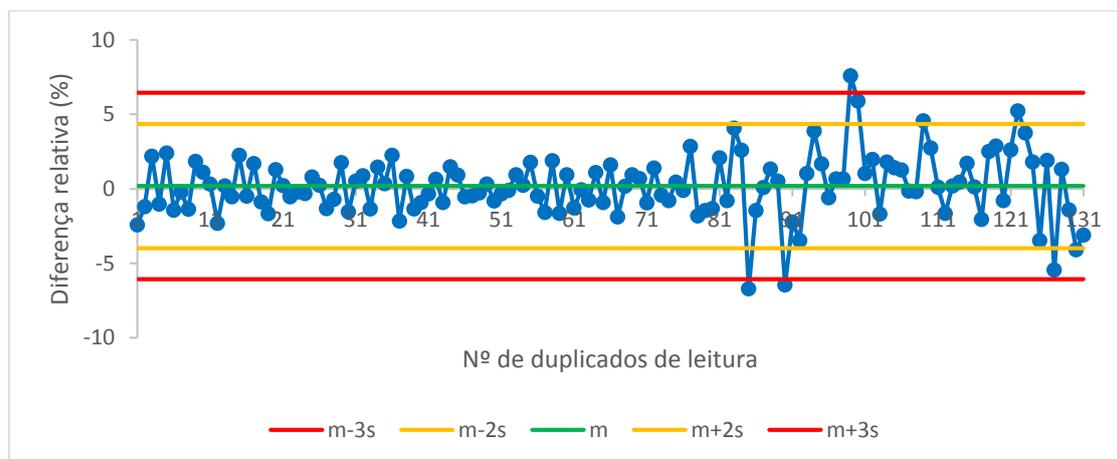


Figura 53 – Carta de controlo para os valores das diferenças relativas (%) dos duplicados de leitura de amostras de peixe.

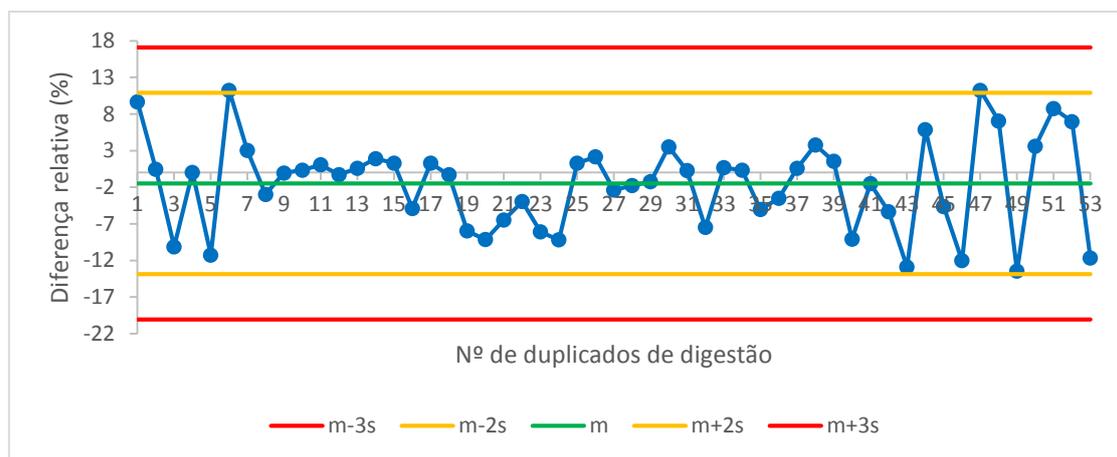


Figura 54 – Carta de controlo para os valores das diferenças relativas (%) dos duplicados de digestão de amostras de peixe.

- **Precisão intermédia**

Tabela 44 – Valores de CV_{S_I} (%) e de $HORRAT_{S_I}$ estimados para o Fe.

Amostras	CV_{S_I} (%)	n	p	$HORRAT_{S_I}$
TORT	5	3	6	0,65
PVLQ	5	5	5	

Incerteza da medição

Tabela 45 – Estimativa da incerteza associada à quantificação do Fe por ICP-OES.

$u_{R_w,rel}$	6,2%
$u_{b,rel}$	7,7%
$u_{c,rel}$	9,4%
U_{rel}	18,8%
U_f	20,0%

6.4. Validação do método de quantificação de Zn em peixe por ICP-OES

Seletividade

- **Testes de recuperação**

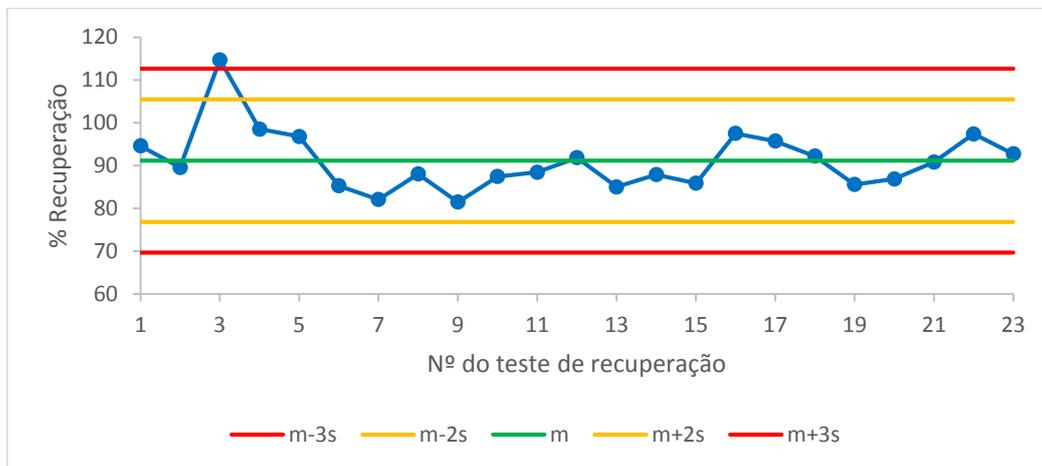


Figura 55 – Carta de controle das percentagens de recuperação de Zn.

- **Interferências espectrais**

Tabela 46 – Valores das leituras efetuadas dos padrões de Cu e Fe para o estudo de interferências espectrais na quantificação de Zn ($\mu\text{g/L}$) por ICP-OES

Avaliação de interferências espectrais na quantificação de Zn ($\mu\text{g/L}$) por ICP-OES	
Cu (1 mg/L)	Fe (1 mg/L)
2,75E+00	7,81E-01
3,15E+00	1,06E+00
3,40E+00	7,05E-01
3,25E+00	9,18E-01
3,36E+00	3,11E-01
3,53E+00	4,21E-01
2,50E+00	1,06E+00
2,35E+00	6,16E-01
2,24E+00	2,41E-01
2,63E+00	6,41E-01

Limites de detecção e quantificação

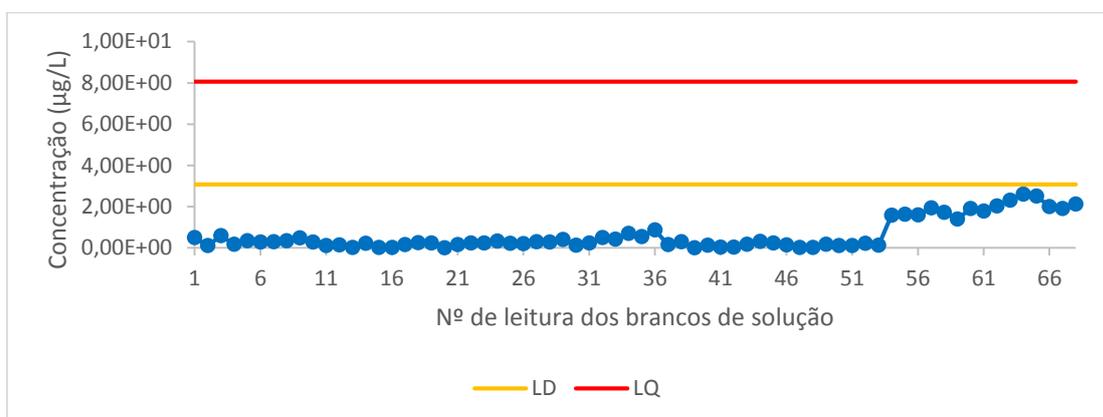


Figura 56 – Carta de verificação dos brancos de solução para o Zn

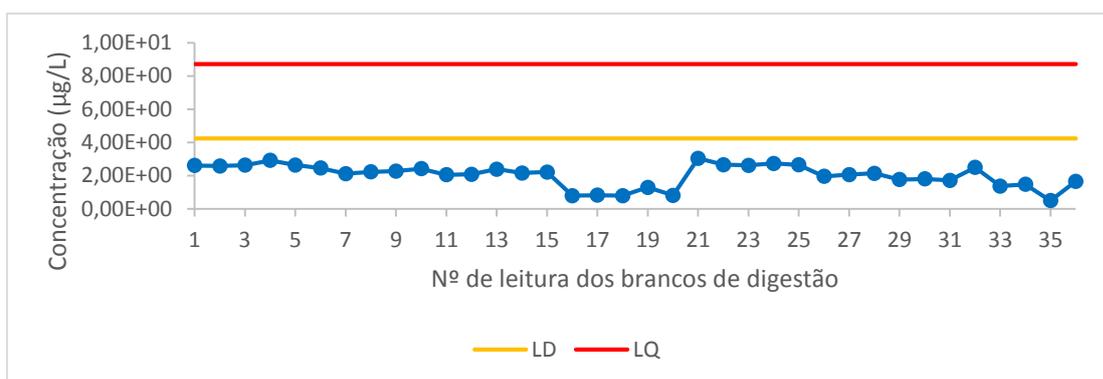


Figura 57 – Carta de verificação dos brancos de digestão para o Zn

Tabela 47 – Limite de detecção e de quantificação do Zn.

Equação	Branco de solução	Branco de digestão
$LD = \bar{x}_0 + 3,3s_0$	3,07E+00 µg/L	4,23E+00 µg/L (1,06E+00 µg/g)
$LQ = \bar{x}_0 + 10s_0$	8,06E+00 µg/L	8,71E+00 µg/L (2,18E+00 µg/g)

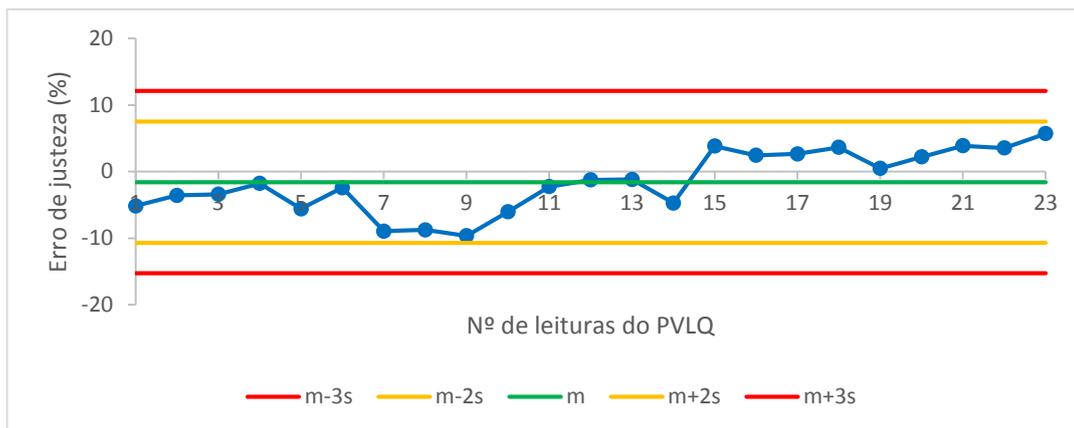


Figura 58 – Carta de controle do erro de justeza da quantificação de Zn no PVLQ.

Quantificação

Tabela 48 – Valores para a definição da função de calibração linear ponderado do Zn do dia 06/04/2016.

Padrão	Conc. (µg/L)	Média Sinal	si	si ²	1/si ²
P0	0,00	4,18E+01	6,62E+00	4,38E+01	2,28E-02
P1	4,00	2,44E+02	2,16E+01	4,68E+02	2,14E-03
P2	8,00	4,19E+02	1,90E+01	3,60E+02	2,78E-03
P3	20,00	1,01E+03	1,24E+01	1,54E+02	6,49E-03
P4	40,00	1,90E+03	6,65E+01	4,42E+03	2,26E-04
P5	80,00	3,93E+03	5,77E+01	3,33E+03	3,01E-04
P6	160,00	7,68E+03	3,82E+01	1,46E+03	6,86E-04
P7	320,00	1,50E+04	2,42E+02	5,85E+04	1,71E-05
Soma	632,00	3,02E+04	4,64E+02	6,87E+04	3,55E-02
Média	79,00	3,78E+03	5,80E+01	8,58E+03	4,43E-03

Tabela 49 – Valores para a definição da função de calibração linear ponderado do Zn do dia 06/04/2016

(continuação).

Padrão	Conc. (µg/L)	wi	wi*xi	wi*yi	wi*xi*yi	wi*xi ²
P0	0,00	5,15E+00	0,00E+00	2,15E+02	0,00E+00	0,00E+00
P1	4,00	4,81E-01	1,93E+00	1,18E+02	4,70E+02	7,70E+00
P2	8,00	6,27E-01	5,02E+00	2,62E+02	2,10E+03	4,01E+01
P3	20,00	1,46E+00	2,93E+01	1,48E+03	2,96E+04	5,86E+02
P4	40,00	5,10E-02	2,04E+00	9,68E+01	3,87E+03	8,16E+01
P5	80,00	6,78E-02	5,43E+00	2,67E+02	2,13E+04	4,34E+02
P6	160,00	1,55E-01	2,48E+01	1,19E+03	1,90E+05	3,96E+03
P7	320,00	3,86E-03	1,23E+00	5,78E+01	1,85E+04	3,95E+02
Soma	632,00	8,00E+00	6,97E+01	3,69E+03	2,66E+05	5,51E+03
Média	79,00	1,00E+00	8,71E+00	4,61E+02	3,33E+04	6,88E+02

Tabela 50 – Valor do erro residual (%) para o Zn nos padrões de calibração.

Padrão	Conc. (µg/L)	Sinal Calculado	Resíduos	Erro residual (%)	[Zn] calculada	Erro relativo (%)
P0	0,00	4,47E+01	-2,89E+00	-6,90	-0,06	-
P1	4,00	2,36E+02	8,45E+00	3,46	4,18	4,4
P2	8,00	4,27E+02	-8,05E+00	-1,92	7,83	2,1
P3	20,00	1,00E+03	1,12E+01	1,11	20,24	1,2
P4	40,00	1,95E+03	-5,83E+01	-3,07	38,78	3,1
P5	80,00	3,87E+03	6,62E+01	1,68	81,39	1,7
P6	160,00	7,69E+03	-5,46E+00	-0,07	159,89	0,1
P7	320,00	1,53E+04	-3,32E+02	-2,22	313,04	2,2

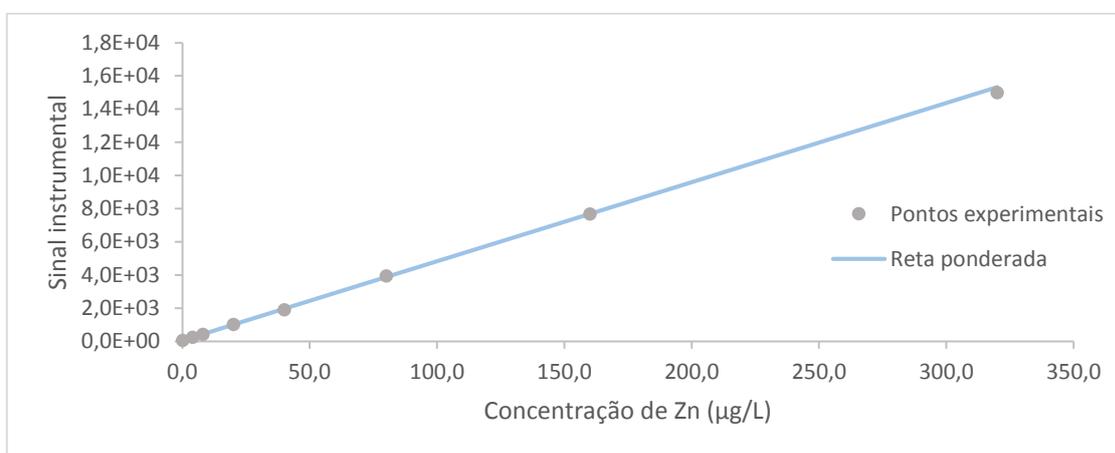


Figura 59 – Função de calibração para a quantificação do Zn no dia 06/04/2016.

Tabela 51 – Parâmetros das funções de calibração obtidas para o Zn.

Data	b_w	a_w	r
11/12/2015	45	43	0,9996
24/02/2016	46	33	0,9999
22/03/2016	45	61	0,9998
06/04/2016	48	45	0,9999
29/04/2016	51	150	0,9999

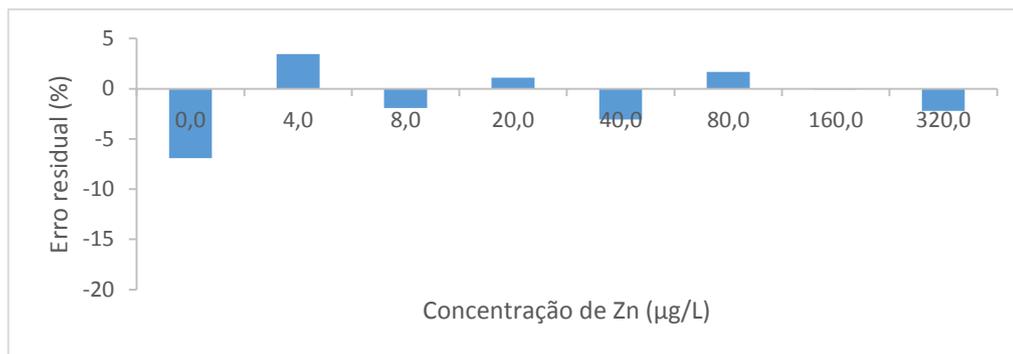


Figura 60 – Erro residual associado aos diferentes padrões de calibração para o Zn, no dia 06/04/2016.

Justeza/veracidade

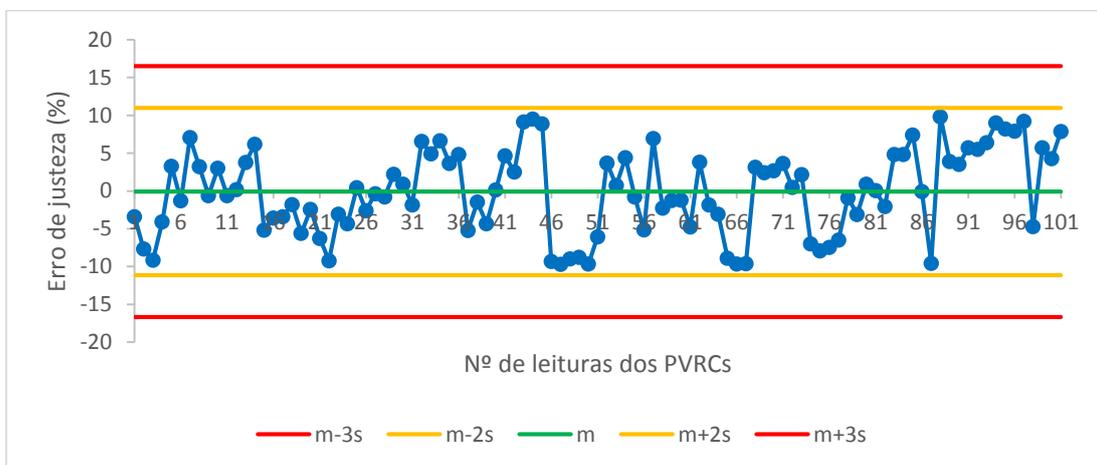


Figura 61 – Carta de controlo do erro de justeza na quantificação do Zn nos PVRCs.

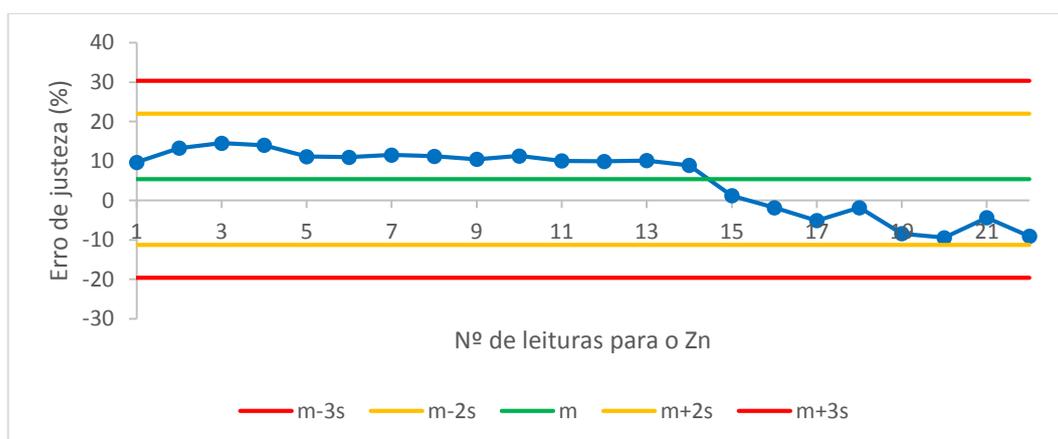


Figura 62 – Carta de controlo do erro de justeza na quantificação do Zn no MRC.

Precisão

- **Desvio padrão relativo associado à leitura instrumental**

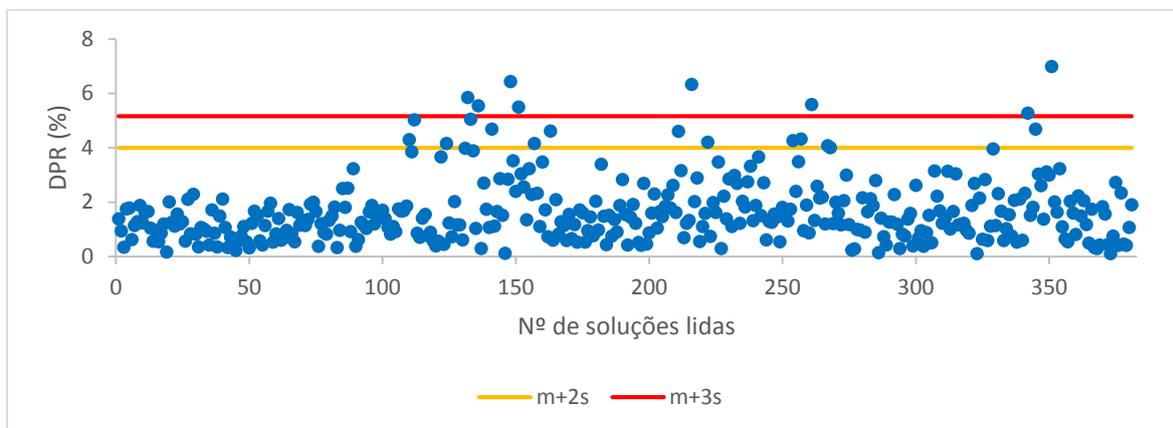


Figura 63 – Carta de controlo dos desvios padrões relativos (%) na quantificação do Zn por ICP-OES.

- **Coefficiente de variação de repetibilidade**

Tabela 52 – Valores de $CV_r(\%)$ e de $HORRAT_r$ estimados para o Zn.

Amostras	$CV_r(\%)$	Nº de leituras por amostra	$HORRAT_r$
TORT	1	10	0,09
C.J.F	9	9	0,90
S.C.G	5	10	0,48
H	7	10	0,61
i	10	10	0,99
PVLQ	4	10	

- **Avaliação de duplicados**

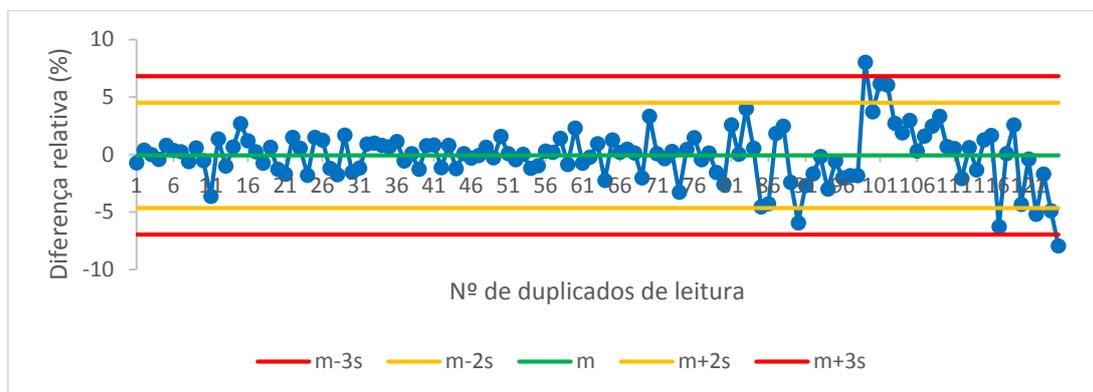


Figura 64 – Carta de controlo para os valores das diferenças relativas (%) dos duplicados de leitura de amostras de peixe.

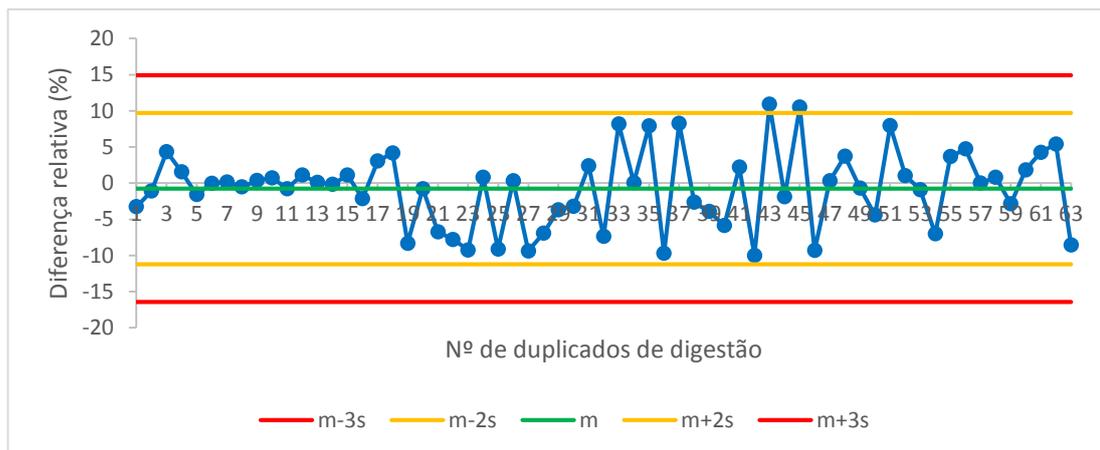


Figura 65 – Carta de controlo para os valores das diferenças relativas (%) dos duplicados de digestão de amostras de peixe.

- **Precisão intermédia**

Tabela 53 – Valores de $CV_{S_I}(\%)$ e de $HORRAT_{S_I}$ estimados para o Zn

Amostras	$CV_{S_I}(\%)$	n	p	$HORRAT_{S_I}$
TORT	7	3	6	0,95
PVLQ	5	5	5	

Incerteza da medição

Tabela 54 – Estimativa da incerteza associada à quantificação do Zn por ICP-OES.

$u_{R_w,rel}$	1,7%
$u_{b,rel}$	5,9%
$u_{c,rel}$	9,9%
U_{rel}	19,7%
U_f	20,0%