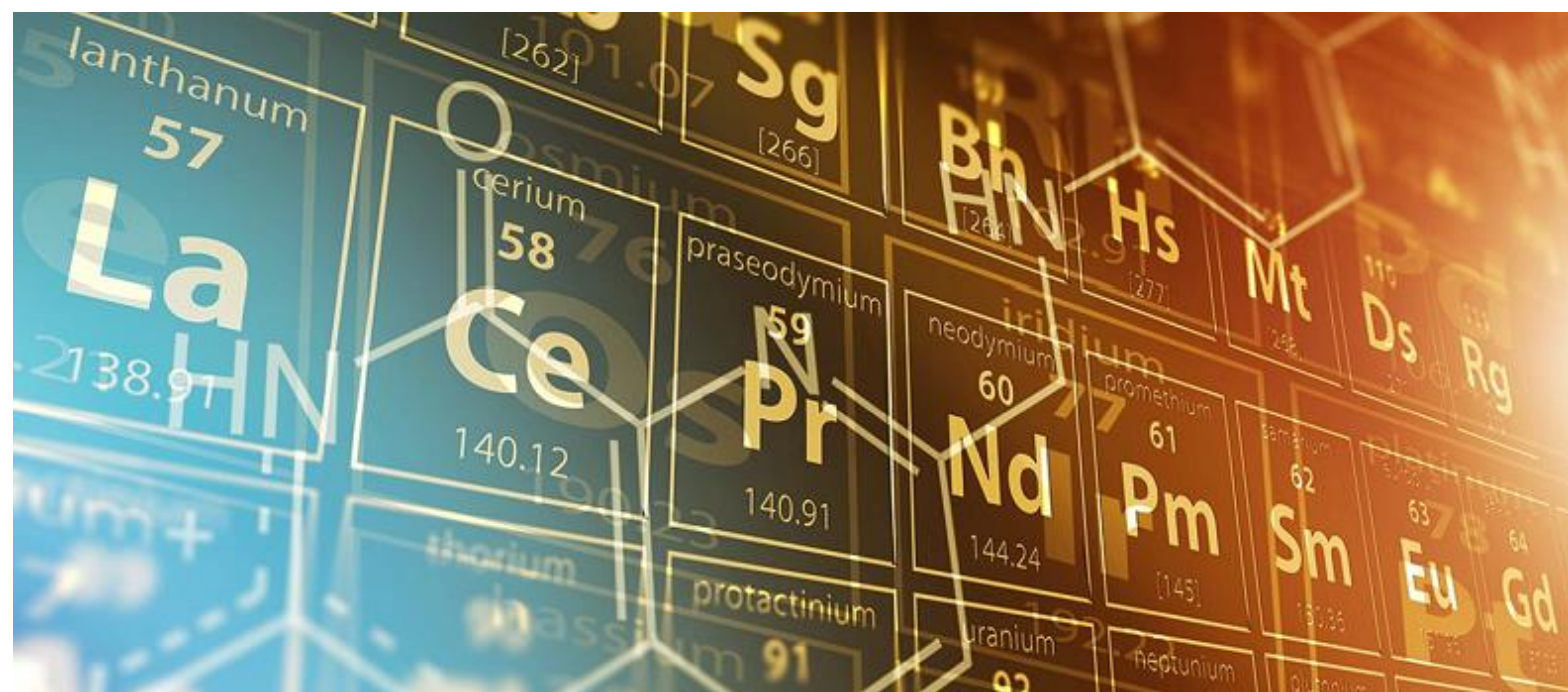




Implementação e validação de um método para a determinação de metais em matrizes alimentares por ICP-MS

ALEXANDRA MACEDO RESENDE PEREIRA

novembro de 2021



Implementação e validação de um método para a determinação de metais em matrizes alimentares por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química, ramo Qualidade

outubro 2021

AUTOR

Alexandra Macedo Resende Pereira

ORIENTAÇÃO

Eng^o Hendrikus Nouws – ISEP

Dr^a Maria Teresa Oliva Teles – ISEP

Eng^a Laura Sousa – Silliker Portugal

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à empresa Silliker Portugal, por me ter permitido realizar a minha dissertação e pela escolha de um tema que se inseria na área onde já trabalhava. Deixo ainda um especial obrigada à Eng^a Laura Sousa por ter supervisionado todo o trabalho e por me ter motivado e ajudado em tudo o que era necessário.

À Dr^a Teresa Teles e ao Eng^o Hendrikus Nouws pela ajuda ao longo de todo este trabalho e, claro, também quero agradecer ao ISEP por me ter recebido e contribuído para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Por fim, um especial obrigado a todas as pessoas que fizeram parte destes cinco anos fantásticos e a quem desejo toda a felicidade do mundo por me terem acompanhado e apoiado tanto nesta fase como em muitas outras, nomeadamente ao João, às Martas, ao Henrique e ao Rui.

Sumário

Atualmente, com o aumento da diversidade de produtos alimentares em resposta ao crescimento da população mundial surgiu a necessidade de efetuar um controlo mais exigente destes produtos de modo a garantir a sua qualidade, segurança alimentar e confiança para o consumidor. Assim, foram desenvolvidos diversos métodos analíticos capazes de analisar, com o nível de exigência necessário, os constituintes presentes nos produtos alimentares, nutricionais e contaminantes e, desta forma, caracterizá-los qualitativa e quantitativamente. Dentro destes constituintes, contaminantes como os metais pesados têm sido alvo de estudo em contexto alimentar. Estes causam efeitos graves na saúde humana sendo por isso crucial a sua determinação. O chumbo, o mercúrio, o cádmio e o arsénio são os metais pesados que apresentam maiores riscos de segurança alimentar, sendo considerados os metais mais tóxicos. De modo a garantir a segurança e qualidade dos produtos consumidos, criaram-se laboratórios acreditados, cujos métodos foram devidamente validados.

A presente dissertação foi desenvolvida na empresa Silliker Portugal, S.A, e teve como objetivo validar estatisticamente o método para quantificar o teor de chumbo, cádmio, mercúrio e arsénio em géneros alimentares por espetrometria de massa com plasma indutivamente acoplado. A espectrometria de massa acoplada a plasma indutivamente é uma técnica de análise multi-elementar, rápida, precisa e exata para a quantificação de elementos vestigiais em amostras líquidas e sólidas.

Neste trabalho mostrou-se que o método analítico apresentava uma correlação linear entre a resposta obtida por ICP-MS e a concentração de analito, sendo que a média dos valores obtidos para arsénio, cádmio, mercúrio e chumbo foi superior a 0,995. Também se verificou que a sensibilidade do método se manteve inalterada ao longo do tempo.

Quanto à precisão do método, mostrou-se que nos níveis de trabalho estudados os valores dos CV foram aceitáveis. Constatou-se, ainda, que não foram evidenciadas ocorrência de erros sistemáticos uma vez que o método mostrou ser justo.

Depois de analisados todos os parâmetros, é possível afirmar que o método foi devidamente validado para a quantificação de Pb, Cd, As e Hg nas matrizes alimentares estudadas.

Palavras-chave: Validação de métodos; Metais pesados; Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado; Segurança alimentar; Controlo de Qualidade

Abstract

With the increase in the diversity of food products, in response to the growth of the world population, there is a need to carry out a more demanding control of these products to guarantee their quality and safety for the consumer. Thus, several analytical methods, capable of analyzing the constituents present in food products, nutritional and contaminants, were developed with the required level of demand and, in this way, characterize them qualitatively and quantitatively. Among the variety of constituents, contaminants as heavy metals have been the subject of study. These cause serious effects on human health and their determination is therefore crucial. Lead, mercury, cadmium, and arsenic are the heavy metals that present the greatest food safety risks, being considered the most toxic metals.

Thus, in order to guarantee the safety and quality of the products consumed, accredited laboratories were created, whose methods were duly validated.

For this reason, the present dissertation developed at Silliker Portugal, S.A., aimed to statistically validate the method to quantify the content of lead, cadmium, mercury and arsenic in foodstuffs by inductively coupled plasma mass spectrometry. Inductively coupled plasma mass spectrometry is a fast, accurate multi-element analysis technique for the quantification of trace elements in liquid and solid samples.

In this work it was shown that the analytical method presented a linear correlation between the response obtained by ICP-MS and the analyte concentration, and the average of the values obtained for arsenic, cadmium, mercury and lead was greater than 0,995. Also it was found that the sensitivity of the method remained unchanged over time.

As for the precision of the method, it was shown that at the work levels studied, the VC values were acceptable. It was also found that the occurrence of systematic errors was not evidenced since the method was shown to be accurate.

After analyzing all parameters, it is possible to affirm that the method was properly validated for the quantification of Pb, Cd, As and Hg in the studied food matrices.

Keywords: Method validation; Heavy metals; Inductively coupled plasma mass spectrometry; Food safety; Quality control.

Siglas e Acrónimos

BIPEA - *Bureau Interprofessionnel d'Etudes Analytiques*

CQE – Controlo de Qualidade Externo

CQI – Controlo de Qualidade Interno

DC – Corrente Contínua

DPCS - Amostra Diária de Controlo de Processo (do inglês *Daily Process Control Sample*)

EFSA - Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (do inglês *European Food Safety Authority*)

EGI - Sociedade de Engenharia e Gestão da Qualidade, Lda

FAPAS - Esquema de Avaliação de Desempenho de Análise de Alimentos (do inglês *Food Analysis Performance Assessment Scheme*)

ICP-MS – Espetrometria/Espetrómetro de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado

LDQ – Limite de Quantificação

MRC – Materiais de Referência Certificados

MS – Espetrómetro de Massa

ORS - Sistema de Reação Octopolar

RF – Radiofrequência

SGQ – Sistema de Gestão de Qualidade

Índice

Agradecimentos.....	i
Sumário.....	iii
Abstract.....	v
Siglas e Acrónimos.....	vii
1. Introdução.....	1
1.1. A Empresa.....	1
1.2. Enquadramento do Tema – Metais Pesados em Alimentos.....	2
1.3. Metais pesados.....	3
1.3.1. Chumbo.....	3
1.3.2. Cádmio.....	3
1.3.3. Mercúrio.....	4
1.3.4. Arsénio.....	4
1.4. Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado.....	5
1.4.1. Componentes ICP-MS.....	6
1.4.1.1. Sistema de Introdução de Amostra.....	6
1.4.1.2. Plasma – fonte de excitação.....	8
1.4.1.3. Interface/Sistema de vácuo.....	10
1.4.1.4. Sistema de Reação Octopolar (ORS).....	11
1.4.1.5. Espectrómetro de Massa (MS) – Quadrupolo.....	11
1.4.1.6. Detetor.....	12
1.4.2. Interferências.....	12
1.4.2.1. Interferências Espectrais.....	12
1.4.2.2. Interferências Não-Espetrais.....	13
1.5. Validação de um método.....	14
1.5.1. Ferramentas usadas na validação de um método.....	15
1.5.1.1. Materiais de Referência Certificados - MRC.....	15

1.5.1.2.	Ensaio Interlaboratoriais.....	16
1.5.1.3.	Ensaio de Recuperação	16
1.5.1.4.	Amostra diária de controlo de processo.....	17
1.5.1.5.	Testes estatísticos.....	17
1.5.2.	Seletividade e Especificidade.....	19
1.5.3.	Quantificação	20
1.5.3.1.	Curva de Calibração.....	20
1.5.3.2.	Limites Analíticos.....	20
1.5.3.3.	Sensibilidade	21
1.5.3.4.	Gama de trabalho	21
1.5.4.	Precisão	22
1.5.4.1.	Em condições de repetibilidade	22
1.5.4.2.	Em condições de precisão intermédia.....	23
1.5.5.	Justeza ou veracidade	23
1.5.6.	Incerteza de medição.....	24
2.	Parte Experimental	27
2.1.	Reagentes e preparação de soluções	27
2.2.	Equipamentos e Utensílios.....	31
2.3.	Procedimento para tratamento e análise de amostras e soluções.....	33
3.	Apresentação e discussão dos resultados	37
3.1.	Linearidade	37
3.2.	Limite de quantificação.....	39
3.3.	Gama de trabalho	40
3.4.	Precisão	40
3.4.1.	Repetibilidade.....	40
3.4.2.	Precisão intermédia.....	48
3.5.	Justeza.....	51

3.5.1. Ensaio de comparação interlaboratorial.....	51
3.5.2. Ensaio de recuperação.....	52
3.6. Seletividade/Especificidade	53
3.7. Estimativa da incerteza do método	54
4. Conclusões	57
Bibliografia.....	59
Anexos	63
A. Teores máximos admissíveis em alimentos.....	63
B. Relatório de <i>performance</i> e Relatório de <i>tune</i>	67
C. Linearidade	69
D. Limite de quantificação	75
E. Repetibilidade.....	77
F. Precisão intermédia	83
G. Justeza.....	85
H. Seletividade e especificidade.....	87
I. Estimativa da incerteza do método.....	93

Índice Figuras

Figura 1.1 - Esquematização do ICP-MS [16]	6
Figura 1.2 – Sistema de Introdução de Amostra [16].....	7
Figura 1.3 - Diagrama de um nebulizador concêntrico típico [17]	7
Figura 1.4-Esquema detalhado de uma tocha e RF coil [16,17].....	8
Figura 1.5 - Esquema de uma tocha ICP e bobina de carga mostrando como a indução plasma acoplado é formado. [17]	9
Figura 1.6 - Mecanismo de conversão de gotículas em iões por ICP. [17].....	9
Figura 1.7 - Vista do sampler e do skimmer cone [18]	10
Figura 1.8 - – Princípio de separação de massa do quadrupolo do ICP-MS [20]	12
Figura 2.1 - Sistema de digestão por micro-ondas	32
Figura 2.2 – Carrossel com tubos de quartzo usados no sistema de digestão	32
Figura 2.3 - Vaso de reação PTFE do micro-ondas [44]	34
Figura B.1 - Performance Report	67
Figura B.2 - Tune Report.....	67
Figura C.1 - Retas de calibração de arsénio	70
Figura C.2 - Retas de calibração de cádmio	71
Figura C.3 - Retas de calibração de mercúrio	72
Figura C.4 - Retas de calibração de chumbo	73

Índice de Tabelas

Tabela 2.1 - Preparação das soluções de calibração de mercúrio [44]	29
Tabela 2.2 - Preparação das soluções de calibração de Arsénio e Selénio [44]	30
Tabela 2.3 - Preparação das soluções de calibração de Al, Sb, Ba, B, Cd, Ca, Pb, Co, Cu, Cr, Sn, Fe, P, Mg, Mn, Mo, Ni, K, Na, V, Zn [44].....	31
Tabela 2.4 - Concentração, em $\mu\text{g/L}$, de Pb e Cd em cada padrão de calibração.....	31
Tabela 2.5 - Massas da toma, em g, a pesar para cada tipo de matriz [44]	33
Tabela 3.1 – Resumo dos principais resultados obtidos: intervalo de trabalho (mg/kg), coeficiente de correlação, nível de avaliação de desempenho (mg/kg), limite de repetibilidade relativo, CV_{r_i} (%), o limite de precisão intermédia relativo, $\text{CV}_{r_{PI}}$ (%), z-score, a taxa de recuperação e a incerteza relativa, U, em %	37
Tabela 3.2 - Declives das retas de calibração traçadas para cada metal.....	38
Tabela 3.3 - Média, desvio padrão e coeficiente de variação dos coeficientes de correlação (r) obtidos das retas de calibração de arsénio, cádmio, mercúrio e chumbo.	39
Tabela 3.4 - Limite de quantificação, em mg/kg, e respetiva validação, tendo em conta a taxa de recuperação, em %, para cada metal	39
Tabela 3.5 - Gama de trabalho, em mg/kg	40
Tabela 3.6 - Valores médios da concentração de chumbo, o desvio padrão da repetibilidade e a variância da repetibilidade para cada matriz, em mg/kg.....	41
Tabela 3.7 - Valores auxiliares necessários para o estudo da precisão em condições de repetibilidade do método, nomeadamente o valor médio da concentração de chumbo nas matrizes consideradas, [Pb] (mg/kg), o desvio padrão de repetibilidade, s_r (mg/kg) e a variância, s^2 (mg/kg), para [Pb] < 0,10 mg/kg.	42
Tabela 3.8 - Valores do coeficiente de variação de repetibilidade (CV_r), em %, do limite de repetibilidade (r), em mg/kg, e do limite de repetibilidade relativo (CV_{r_i}), em %, obtidos para cada matriz considerada no estudo da repetibilidade para o nível [Pb]< 0,10 mg/kg.....	43
Tabela 3.9 - Valores auxiliares necessários para o estudo da precisão em condições de repetibilidade do método, nomeadamente o valor médio da concentração de chumbo nas matrizes consideradas, [Pb] (mg/kg), o desvio padrão de repetibilidade, s_r (mg/kg) e a variância, s^2 (mg/kg), no nível de $0,10 \leq [\text{Pb}] \leq 0,40$ mg/kg.....	43
Tabela 3.10 - Valores do coeficiente de variação de repetibilidade (CV_r), em %, do limite de repetibilidade (r), em mg/kg, e do limite de repetibilidade relativo (CV_{r_i}), em %,	

obtidos para cada matriz considerada no estudo da repetibilidade para o nível 0,10 $\leq[\text{Pb}] \leq 0,40$ mg/kg.....	44
Tabela 3.11 - Valores auxiliares necessários para o estudo da precisão em condições de repetibilidade do método, nomeadamente o valor médio da concentração de chumbo nas matrizes consideradas, $[\text{Pb}]$ (mg/kg), o desvio padrão de repetibilidade, s_r (mg/kg) e a variância, s^2 (mg/kg), para $[\text{Pb}] > 0,40$ mg/kg.....	44
Tabela 3.12 - Valores do coeficiente de variação de repetibilidade (CV_r), em %, do limite de repetibilidade (r), em mg/kg, e do limite de repetibilidade relativo ($\text{CV}_{r,r}$), em %, obtidos para cada matriz considerada no estudo da repetibilidade para o nível $[\text{Pb}] > 0,40$ mg/kg.....	45
Tabela 3.13 - Valores do coeficiente de variação de repetibilidade (CV_r), do limite de repetibilidade (r) e, do limite de repetibilidade relativo ($\text{CV}_{r,r}$) obtidos para o chumbo.	45
Tabela 3.14 - Valores do coeficiente de variação de repetibilidade (CV_r), do limite de repetibilidade (r) e, do limite de repetibilidade relativo ($\text{CV}_{r,r}$) obtidos para cada metal.	46
Tabela 3.15 - Valores do desvio padrão da precisão intermédia, S_i (mg/kg), do coeficiente de variação de precisão intermédia, CV_{PI} (%), e do limite de precisão intermédia relativo, CV_{rPI} (%), obtidos para cada nível de trabalho considerado no estudo da precisão em condições de precisão intermédia.....	48
Tabela 3.16 - Análise da precisão intermédia através dos valores do desvio padrão da precisão intermédia, S_i (mg/kg), do coeficiente de variação médio, CV_{PI} (%) e do limite de precisão intermédia, CV_{rPI} (%).....	50
Tabela 3.17 – Avaliação da justeza: valores médios obtidos pelo laboratório, Pb_{lab} , para a concentração de chumbo em amostras analisadas em ensaios interlaboratoriais, juntamente com o valor de referência da concentração de chumbo nessas amostras, Pb_{ref} , ambas em $\mu\text{g}/\text{kg}$, o respetivo desvio padrão (s) e z-score. O valor n corresponde ao número de laboratórios que participaram no ensaio interlaboratorial.	51
Tabela 3.18 - Avaliação da justeza: valores médios obtidos pelo laboratório, As_{lab} , para a concentração de arsénio em amostras analisadas em ensaios interlaboratoriais, juntamente com o valor de referência da concentração de arsénio nessas amostras, As_{ref} , ambas em $\mu\text{g}/\text{kg}$, o respetivo desvio padrão (s) e z-score. O valor n corresponde ao número de laboratórios que participaram no ensaio interlaboratorial.	52
Tabela 3.19 - Avaliação da justeza: valores médios obtidos pelo laboratório, Cd_{lab} , para a concentração de cádmio em amostras analisadas em ensaios interlaboratoriais,	

juntamente com o valor de referência da concentração de cádmio nessas amostras, <i>Cdref</i> , ambas em $\mu\text{g/kg}$, o respetivo desvio padrão (<i>s</i>) e z-score. O valor <i>n</i> corresponde ao número de laboratórios que participaram no ensaio interlaboratorial.	52
Tabela 3.20- Avaliação da justeza: valores médios obtidos pelo laboratório, <i>Hglab</i> , para a concentração de mercúrio em amostras analisadas em ensaios interlaboratoriais, juntamente com o valor de referência da concentração de mercúrio nessas amostras, <i>Hgref</i> , ambas em $\mu\text{g/kg}$, o respetivo desvio padrão (<i>s</i>) e z-score. O valor <i>n</i> corresponde ao número de laboratórios que participaram no ensaio interlaboratorial.	52
Tabela 3.21 – Valores da taxa de recuperação, em percentagem, dos metais em estudo para as diferentes matrizes e respetiva média.....	53
Tabela 3.22 – Taxa de recuperação aparente, em %, respetiva a cada metal.	54
Tabela 3.23 – Incerteza associada a cada metal e respetivos níveis de trabalho, em %. 55	
Tabela A.1 - Teores máximos de chumbo em alimentos fixados pela União Europeia, segundo o regulamento N° 1881/2006 da Comissão Europeia, de 19 de dezembro de 2006 [8].....	63
Tabela A.2 - Teores máximos de cádmio em alimentos, fixados pela União Europeia, segundo o regulamento N° 488/2014 da Comissão Europeia de 12 de maio de 2014 [10]	64
Tabela A.3 - Teores máximos de mercúrio em alimentos fixados pela União Europeia, segundo o regulamento N° 1881/2006 da Comissão Europeia, de 19 de dezembro de 2006. [8].....	65
Tabela A.4 - Limites máximos de arsénio, na forma inorgânica, permitidos em arroz e produtos à base de arroz.[14].....	65
Tabela C.1 - Coeficiente de correlação das retas de calibração de arsénio.	70
Tabela C.2 - Coeficiente de correlação das retas de calibração de cádmio.....	71
Tabela C.3 - Coeficiente de correlação das retas de calibração de mercúrio.	72
Tabela C.4 - Coeficiente de correlação das retas de calibração de chumbo.....	73
Tabela E.1 – Concentração de chumbo, em mg/kg , dos ensaios realizados para cada matriz em condições de repetibilidade	78
Tabela E.2 - Teste de Grubbs	80
Tabela E.3 - Teste de Cochran.....	81
Tabela F.1 - Valores auxiliares necessários para a determinação da precisão intermédia no nível de trabalho baixo, $[\text{Pb}] < 0,10 \text{ mg/kg}$, nomeadamente, a concentração de chumbo em dois ensaios, bem como o valor médio obtido, em mg/kg	83

Tabela H.1 – Ensaio de recuperação para o elemento Pb: Resultados obtidos(mg/kg) para diversas matrizes, sem e com contaminação. * - Resultado não considerado.....	88
Tabela H.2 – Taxa de recuperação (%) do chumbo em várias matrizes e respetiva média.	91
Tabela H.3 – Resultados de chumbo ($\mu\text{g}/\text{kg}$) para a matriz cacau, a respetiva média e valores aceitáveis para a mesma.....	91

1. Introdução

Numa era em que a preocupação por uma alimentação consciente é crescente, é essencial que as empresas ligadas à indústria alimentar possam garantir a segurança dos produtos que comercializam. Como consequência, foram surgindo em todo o mundo inúmeros laboratórios de ensaio que permitem analisar os produtos alimentares de modo a garantir que estes são de confiança e, como tal, não prejudicam a saúde dos consumidores. De modo a avaliar a qualidade dos produtos alimentares, os laboratórios devem ter um Sistema de Gestão da Qualidade (SGQ) que consiste no conjunto de procedimentos e responsabilidades que uma empresa ou organização implementa de modo a estabelecer os seus objetivos e recursos para efetuar medições corretas. [1] Para além disso, os laboratórios também podem ser acreditados o que significa que os métodos utilizados nos laboratórios foram devidamente avaliados por entidades de acreditação e, como tal, a competência do laboratório é reconhecida mundialmente. [2]

Deste modo, em laboratórios acreditados, é possível determinar os diversos parâmetros que caracterizam um produto alimentar, nomeadamente, a presença de microrganismos ou a quantidade dos diversos constituintes dos alimentos, geralmente apresentados no rótulo do produto, como o teor de ácidos gordos, de açúcares, de proteínas, de metais, entre outros. Assim, espera-se que os resultados sejam obtidos com uma maior confiança e que, desta forma seja possível diminuir a insegurança alimentar.

Desta forma, o presente trabalho, desenvolvido na Silliker Portugal, S.A., teve como objetivo avaliar o desempenho de uma metodologia utilizada no laboratório de ensaio, que permite quantificar, com um determinado grau de confiança, os níveis de chumbo, cádmio, mercúrio e arsénio em diversos produtos alimentares, recorrendo a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).

1.1. A Empresa

A Silliker Portugal, S.A. é uma empresa de prestação de serviços ligada aos diversos ramos do setor agro-alimentar. Em julho de 1992, em Vila Nova de Gaia, surge como EGI - Sociedade de Engenharia e Gestão da Qualidade, Lda., que rapidamente toma a posição de líder nacional no setor, numa altura em que a oferta de serviços de análises e assessoria escasseia para uma necessidade de prevenção da qualidade e segurança alimentar acentuada. É então em 1993 que integra o Sistema Português da Qualidade

através da acreditação do seu laboratório, segundo a norma ISO/IEC 17025. No ano 2000 surge o laboratório de análise sensorial, conseqüente do reconhecimento da importância da avaliação organoléptica de produtos de consumo. Devido ao forte crescimento, em 2005, a EGI expande as suas instalações para albergar todos os seus serviços. Em 2008, a multinacional norte-americana Silliker adquire a EGI, dando assim origem à Silliker Portugal, S.A., passando a integrar um dos maiores grupos a nível mundial na prestação de serviços na área da qualidade e segurança alimentar. É desde 2014 que a Silliker se apresenta como Mérieux NutriSciences. [3]

As instalações da Silliker Portugal estão repartidas em duas áreas: Administrativa e Laboratorial. Os laboratórios existentes de análises físico-químicas, microbiológicas, métodos instrumentais de análise e análise sensorial estão equipados com uma equipa de analistas habilitados a realizar as mais diversas técnicas de análise e meios técnicos adequados. [3]

1.2. Enquadramento do Tema – Metais Pesados em Alimentos

A ingestão de alimentos é algo crucial para a sobrevivência humana. Como tal é imprescindível garantir a qualidade destes. Os alimentos podem representar riscos para a saúde caso estejam contaminados, sendo os metais uma das possíveis fontes de contaminação. Alguns dos metais são altamente tóxicos, mesmo que ingeridos em pequenas quantidades. O controlo da contaminação de géneros alimentícios (por exemplo, produtos agrícolas, produtos de pesca e pecuária, outras matérias-primas e de produtos processados) por metais é fundamental para minimizar a exposição a este tipo de contaminantes. Esta necessidade de controlo pode surgir quer da parte da indústria alimentar, quer de outros elos da cadeia económica que pretendam verificar a conformidade dos produtos que adquirem. [4]

Os metais pesados são constituintes naturais da crosta terrestre, estando amplamente espalhados na natureza. Através de processos naturais de erosão das formações rochosas, são libertados para o ambiente, surgindo nos solos, rios, lagos e mares. Por outro lado, as atividades industriais como a combustão industrial de carvão, as fundições, incineração de resíduos, contribuem para aumentar as emissões de metais pesados na atmosfera. [5]

Os metais pesados causam efeitos graves na saúde que envolvem a reduções no crescimento e desenvolvimento, cancro, danos no sistema nervoso, entre outros, sendo as crianças particularmente sensíveis, sendo por isso crucial a sua determinação. O chumbo, o mercúrio, o cádmio e o arsénio são os metais pesados que apresentam maiores riscos de segurança alimentar, [5] sendo considerados pela Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA) os metais mais tóxicos. [4]

Assim sendo, este trabalho foca-se no desenvolvimento de uma metodologia de ICP-MS para análise dos elementos cádmio, chumbo, mercúrio e arsénio.

1.3. Metais pesados

1.3.1. Chumbo

O chumbo, Pb, é um metal que está presente naturalmente no ambiente ou é introduzido através de atividades humanas, como a mineração e atividade industrial. Os seres humanos estão expostos ao chumbo através da água, solo, poeiras e alimentação, sendo esta última a principal fonte de exposição. [6]

Dependendo da exposição ao chumbo, este pode causar danos cerebrais, paralisia, anemia, sintomas gastrointestinais, problemas nos rins e nos sistemas reprodutor, imunitário e nervoso. [7]

Na tabela A.1. do Anexo A, apresentam-se os teores máximos de chumbo em alimentos fixados pela União Europeia, segundo o regulamento N° 1881/2006 da Comissão Europeia, de 19 de dezembro de 2006, sendo o limite admissível mais elevado de 1,5 mg/kg para moluscos/bivalves e o limite admissível mais baixo de 0,020 mg/kg para produtos lácteos. [8]

1.3.2. Cádmio

O cádmio, Cd, está presente naturalmente no meio ambiente na sua forma inorgânica como resultado de emissões vulcânicas e desgaste das rochas. O cádmio é libertado no meio ambiente por águas residuais e incineração de resíduos, e a contaminação de solos agrícolas pode ocorrer pelo uso de fertilizantes, por deposição de ar e pelo conteúdo de esgoto que contem cádmio. Os aumentos nos níveis de cádmio no solo resultam num aumento na absorção de cádmio pelas plantas, dependendo da espécie

da planta, do pH e de outras características do solo. Organismos alimentares comestíveis, como moluscos, crustáceos e fungos, são acumuladores naturais de cádmio. [9]

O cádmio afeta principalmente os rins, e está também associado a danos pulmonares. [7]

Na tabela A.2. do Anexo A, apresentam-se os teores máximos de cádmio em alimentos, fixados pela União Europeia, segundo o regulamento N° 488/2014 da Comissão Europeia de 12 de maio de 2014 que altera o Regulamento (CE) n.o 1881/2006, sendo o limite admissível mais elevado de 1,0 mg/kg para moluscos, cefalópodes, cogumelos, rins e suplementos alimentares e o limite admissível mais baixo de 0,0010 mg/kg para fórmulas em pó feitas a partir de produtos lácteos. [10]

1.3.3. Mercúrio

O mercúrio, Hg, é um metal presente no meio ambiente devido a fontes naturais e antropogénicas. Após a sua libertação no meio ambiente, este elemento passa por complexas transformações e ciclos entre a atmosfera, o solo e os sistemas aquáticos. Durante este ciclo biogeoquímico, humanos, plantas e animais são expostos ao mercúrio, resultando potencialmente numa variedade de impactos à saúde, tais como problemas renais e danos no sistema nervoso. [7, 11]

O mercúrio é amplamente distribuído em alimentos em níveis muito baixos, e principalmente na forma inorgânica menos tóxica, mas a forma mais tóxica de mercúrio, metilmercúrio, é encontrada em níveis significativos em peixes e frutos do mar. [7]

Na tabela A.3. do Anexo A, apresentam-se os teores máximos de mercúrio em alimentos fixados pela União Europeia, segundo o regulamento N° 1881/2006 da Comissão Europeia, de 19 de dezembro de 2006, sendo o limite admissível mais elevado de 1,0 mg/kg e o limite admissível mais baixo de 0,50 mg/kg, ambos para produtos de pescado, dependendo da espécie. [8]

1.3.4. Arsénio

O arsénio, As, é um semimetal que é encontrado no meio ambiente como resultado de ocorrência natural ou da atividade humana. A principal fonte de exposição para a população é a alimentação, especialmente através de alimentos como cereais e produtos à base de cereais, algas, arroz e produtos à base de arroz, peixe e vegetais. [12] A ingestão

de alimentos contendo arsénio inorgânico é de extremo perigo uma vez que este tem propriedades cancerígenas. [7]

O arsénio pode ser encontrado na sua forma orgânica ou inorgânica, sendo a sua forma inorgânica a mais tóxica. Nas espécies onde é detetado arsénio orgânico, nomeadamente espécies marinhas, mesmo que sejam poucos os casos, os valores são vestigiais [12]. Posto isto, se a concentração de arsénio total for inferior ao teor máximo admissível para o arsénio na forma inorgânica, a amostra é considerada conforme com o teor máximo para o arsénio na forma inorgânica não sendo necessário fazer a especificação do arsénio no alimento em análise. [13]

No Regulamento (EU) 2015/1006, apenas são abordados os limites máximos de arsénio, na forma inorgânica, permitidos em arroz e produtos à base de arroz, que se apresentam na tabela A.4. do Anexo A, sendo o limite admissível mais elevado de 0,30 mg/kg para alguns produtos à base de arroz e o limite admissível mais baixo de 0,10 mg/kg para produtos contendo arroz e destinados aos mais jovens. [14]

1.4. Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado

A espectrometria de massa acoplada a plasma indutivamente é uma técnica de análise multi-elementar, rápida, precisa e exata para a quantificação de elementos vestigiais em amostras líquidas e sólidas. Conseguem-se analisar em simultâneo cerca de 20 a 30 elementos numa amostra. [15]

O espectrómetro de massa acoplado a plasma indutivo foi desenvolvido no final dos anos oitenta com a finalidade de aliar a simplicidade de um sistema de introdução de amostra e rapidez de análise de um ICP, à exatidão e baixos limites de deteção de um espectrómetro de massa. Desta combinação resultou um equipamento capaz de efetuar uma análise de vestígios multi-elementar, esquematizado na figura 1.1. [15]

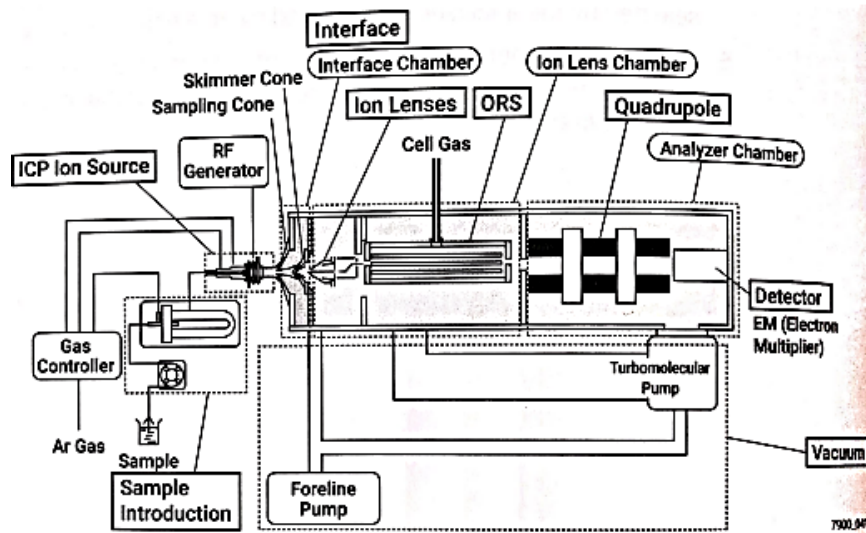


Figura 1.1 - Esquematização do ICP-MS [16]

1.4.1. Componentes ICP-MS

1.4.1.1. Sistema de Introdução de Amostra

O sistema de introdução de amostra de um ICP-MS é constituído por uma bomba peristáltica, um nebulizador e uma câmara de nebulização.

O ICP-MS apresenta uma bomba peristáltica integrada que controla o fluxo de solução de amostra para o instrumento, bombeando continuamente a solução da amostra para o nebulizador, que dispersa a amostra, por formação de aerossóis que são arrastados por uma corrente de gás de árgon (gás nebulizador) para uma câmara de pulverização de passagem dupla [16]. De modo a remover as gotas de amostra maiores, o aerossol é direcionado para um tubo central do comprimento da câmara. Ao atingir o fim da câmara de nebulização, as gotas de maiores dimensões caem por gravidade e são expelidas por um canal de drenagem [17]. Para evitar que a câmara de pulverização se encha de líquido, o canal de drenagem da bomba peristáltica remove constantemente o excesso de solução de amostra. [16] Este sistema encontra-se representado na figura 1.2.

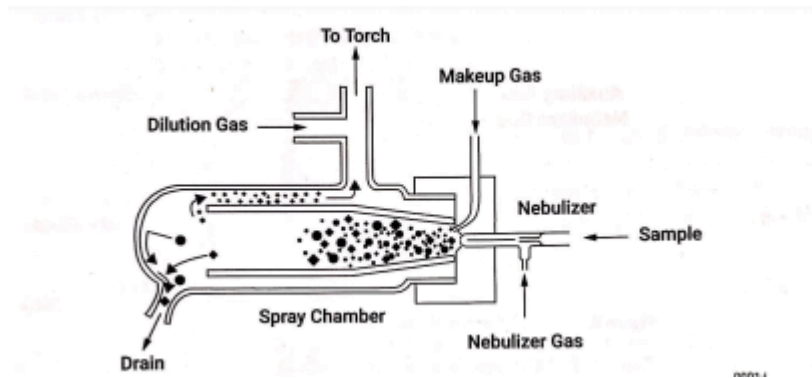


Figura 1.2 – Sistema de Introdução de Amostra [16]

De modo a arrefecer a câmara de pulverização é necessário a utilização de um refrigerador. Este refrigerador permite que a temperatura dentro da câmara seja precisamente controlada, levando a um sinal de iões muito estável. Além disso, também diminui a produção de óxidos, condensando o vapor de água no plasma, o que, por sua vez, reduz a interferência em certos analitos. [16]

> Nebulizador

Existem vários tipos de nebulizadores, sendo estes: concêntrico, de fluxo cruzado e de micro fluxo. O nebulizador utilizado é do tipo concêntrico, representado na figura 1.3. [17]

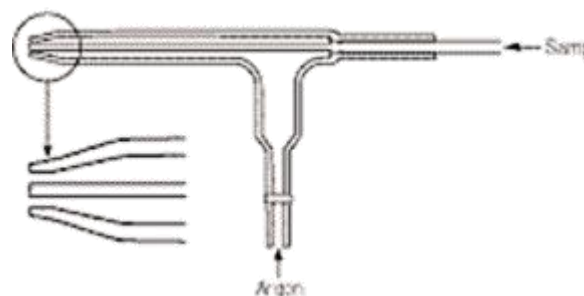


Figura 1.3 - Diagrama de um nebulizador concêntrico típico [17]

No nebulizador concêntrico, a solução é introduzida por meio de um tubo capilar para uma região de baixa pressão criado por um gás que flui rapidamente no fim do capilar. A combinação de uma baixa pressão com o gás a alta velocidade tem como propósito transformar a solução num aerossol. Nebulizadores pneumáticos concêntricos fornecem excelente sensibilidade e estabilidade, particularmente com soluções limpas. No entanto,

os pequenos orifícios podem ser afetados por problemas de bloqueio, especialmente se forem aspiradas muitas amostras de matriz pesada. [17]

1.4.1.2. Plasma – fonte de excitação

O plasma é gerado fazendo passar o argônio através de três tubos concêntricos (a tocha) e acondicionado no final por uma bobina de radiofrequência (RF) [15]. Os tubos são normalmente de quartzo, sendo o tubo central o injetor da amostra. [17] Na figura 1.4. encontra-se representado um esquema deste componente do ICP-MS.

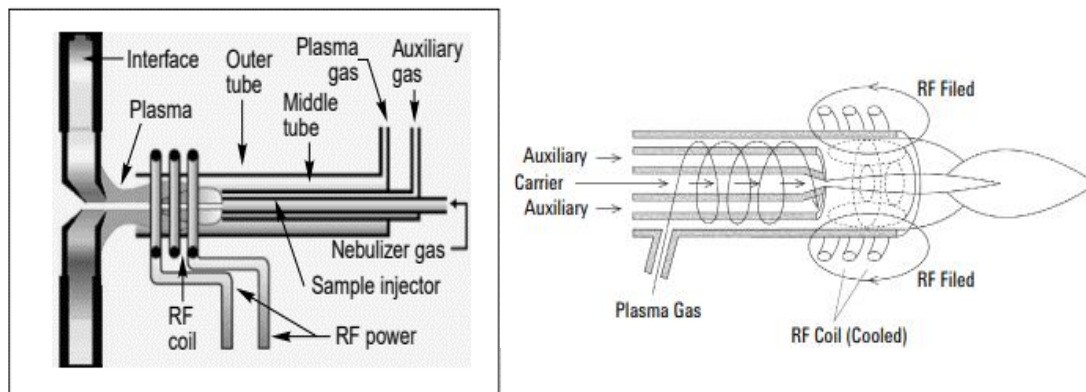


Figura 1.4-Esquema detalhado de uma tocha e RF coil [16,17]

O gás nebulizador transporta a amostra sob a forma de um fino aerossol no tubo injetor da amostra. O gás auxiliar circula entre o tubo de introdução da amostra e o tubo do meio. Este gás tem como função o aumento da separação entre o plasma e a tocha, reduzindo assim a temperatura na extremidade do tubo injetor, o que evita a deposição de matéria dissolvida no mesmo. O gás do plasma circula entre o tubo do meio e o tubo mais externo. A sua função é arrefecer o tubo mais externo da tocha. [17]

› Formação de uma descarga de ICP

Todo este processo está representado na figura 1.5. Primeiro um fluxo tangencial de argônio é direcionado entre o tubo externo e o intermediário da tocha (figura 1.5. (a)). Uma bobina, geralmente de cobre, que envolve a extremidade superior da tocha, está conectada a um gerador de radiofrequência. Quando a potência de RF é aplicada à bobina de carga, uma corrente oscila dentro da bobina a uma taxa correspondente à frequência do gerador. Esta oscilação de RF da corrente na bobina leva à criação de um campo eletromagnético intenso no topo da tocha (figura 1.5. (b)). Com argônio a percorrer a tocha, uma faísca de alta tensão é aplicada ao gás, o que faz com que alguns elétrons sejam retirados dos seus

átomos de argón (figura 1.5. (c)). Estes eletrões vão colidir com outros átomos de árgon, separando ainda mais eletrões. Esta colisão induzida por ionização do árgon continua numa reação em cadeia (Figura 1.5. (d)), formando o que é conhecido como uma descarga de plasma indutivamente acoplada. O aerossol de amostra é introduzido para o plasma através do tubo central, chamado de injetor de amostra (Figura 1.5. (e)). [17]

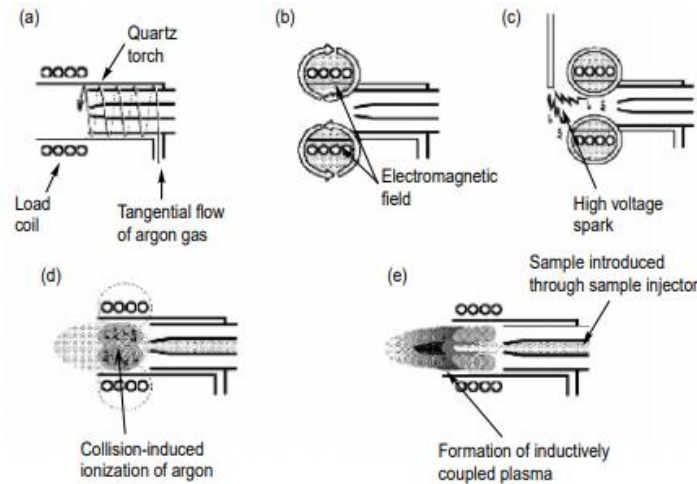


Figura 1.5 - Esquema de uma tocha ICP e bobina de carga mostrando como a indução plasma acoplado é formado. [17]

› Ionização da amostra

Ao percorrer o plasma, as gotículas de líquido contendo a matriz da amostra e os elementos a determinar são secas (remoção das moléculas de água), convertidas em pequenas partículas sólidas, e em seguida aquecidas até ao estado gasoso e atómico. À medida que os átomos viajam pelo plasma, tendem a absorver mais energia e libertam eletrões para formar iões com carga unitária que sai do plasma e entra na região da interface [17]. O processo de conversão das gotículas em iões encontra-se esquematizado na figura 1.6.

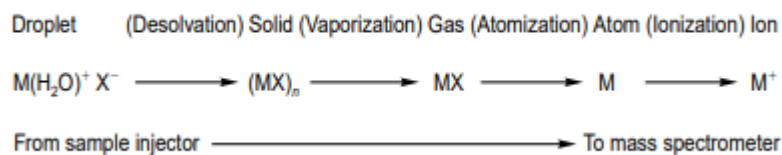


Figura 1.6 - Mecanismo de conversão de gotículas em iões por ICP. [17]

1.4.1.3. Interface/Sistema de vácuo

O objetivo da interface, representada na figura 1.4., é transportar os iões, eficientemente e com integridade elétrica, do plasma (que se encontra à pressão atmosférica) até ao espectrómetro de massa, em vácuo. [18]

Na primeira fase de vácuo, os iões passam através de um orifício na placa frontal da interface para uma câmara de vácuo, referida como cone de amostragem (*sampling cone*), que é uma região de expansão evacuada por uma bomba rotativa. Os iões então passam através de um segundo orifício denominado *skimmer cone*, que atua como um orifício entre a interface e a câmara de vácuo intermediária [16]. Os cones estão representados na figura 1.7. Os iões são extraídos da zona de interface e colimados por um conjunto de lentes iónicas, controlados electrostaticamente [18]. Posteriormente os iões são evacuados para uma zona de alto vácuo obtido por uma bomba turbomolecular. [16]

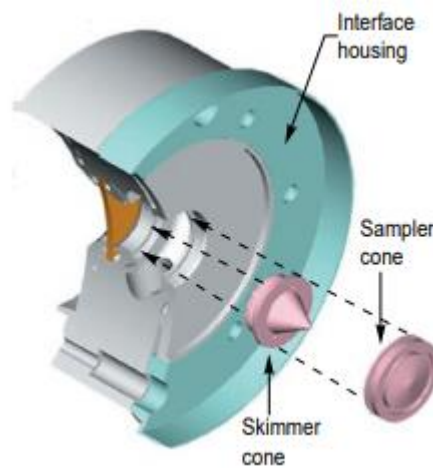


Figura 1.7 - Vista do sampler e do skimmer cone [18]

O problema inerente reside no facto de o ICP-MS ser relativamente ineficiente: apenas um em cada milhão de iões gerados no plasma atinge o detetor. Um dos fatores que mais contribui para esta baixa eficiência é a elevada concentração de elementos de matriz comparativamente com os dos analitos, provocando assim um desvio dos iões na sua trajetória e alterando as características de transmissão do feixe iónico. [19]

Um papel secundário, mas também muito importante do sistema ótico é impedir partículas, espécies neutras e fotões de passar para o espectrómetro de massa e para o detetor. Essas espécies causam instabilidade de sinal e contribuem para ruído de fundo, o que acaba por afetar o desempenho do sistema. [19]

1.4.1.4. Sistema de Reação Octopolar (ORS)

O *Octopole Reaction System* ou Sistema de Reação Octopolar (ORS) é um guia de iões octopolar contido dentro de um recipiente de aço inoxidável e pressurizado com um gás, na maioria das vezes He ou H₂. O ORS é posicionado entre o conjunto de lentes de iões e o filtro do espectrómetro de massa. Conforme os iões da amostra entram nesta célula, estes interagem com o gás, o que leva a que estes se desintegram, através de reações de colisão, em outros iões que podem ser separados no espectrómetro de massa, resultando na redução da interferência molecular, eliminando as principais interferências provenientes da matriz da amostra. [16]

1.4.1.5. Espectrómetro de Massa (MS) – Quadrupolo

O quadrupolo encontra-se posicionado entre o sistema de lentes e o detetor, e é mantido a vácuo com uma bomba turbomolecular. É constituído por quatro longas hastes de metal, que são dispostas paralelamente entre si, onde é aplicada uma corrente contínua (DC) e um potencial de radiofrequência. [16] Os iões são introduzidos na zona central e no início das hastes de metal. O princípio de atuação do quadrupolo baseia-se numa combinação específica de corrente e amplitude de radiofrequência de modo a permitir a passagem dos iões com uma determinada massa/carga. Todos os iões com valor mais baixo ou mais elevado de razão massa/carga são desviados e neutralizados [15]. Na figura 1.8. apresenta-se um exemplo simplificado do modo de atuação do quadrupolo. O analito (a preto) e quatro outros iões (coloridos) chegam à entrada das quatro hastes do quadrupolo, e, quando uma determinada voltagem RF-DC aplicada, o ião do analito em interesse vai ser direcionado, mantendo a sua trajetória ao longo do quadrupolo, onde será posteriormente convertido em pulsos elétricos no detetor. Os restantes iões com diferentes razões massa/carga vão ser dirigidos para os espaços entre as hastes e são desviados do detetor. Este processo é repetido para os restantes analitos com outras razões massa/carga até ser efetuada uma análise multielementar da amostra. [20]

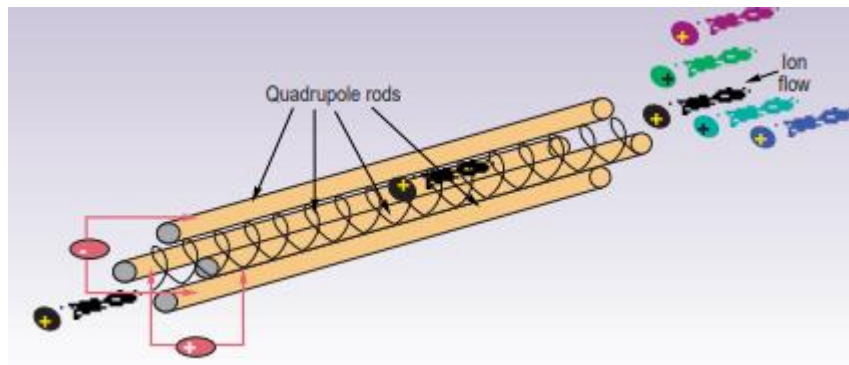


Figura 1.8 -- Princípio de separação de massa do quadrupolo do ICP-MS [20]

O quadrupolo define a capacidade de separar o pico de um analito de uma interferência espectral, e caracteriza a resolução (R) do espectrómetro de massa, que é traduzida pela equação 1.1.

$$R = m/\Delta m \quad \text{(Equação 1.1)}$$

m - Massa nominal à qual o pico ocorre; Δm - Diferença de massa entre dois picos. [20]

1.4.1.6. Detetor

O sistema de deteção de um ICP-MS efetua a contagem dos iões que emergem do espectrómetro de massa. Quando um ião entra no multiplicador de eletrões o ião atinge o primeiro dínodo resultando na libertação de eletrões. Os eletrões atingem, então, o próximo dínodo, gerando mais eletrões. Este processo repete-se pelos vários dínodos, sendo os múltiplos eletrões produzidos detetados como um sinal elétrico que é posteriormente contabilizado pelo circuito integrado. A magnitude dos pulsos elétricos corresponde ao número de iões de analito presentes na amostra. [16, 21]

1.4.2. Interferências

1.4.2.1. Interferências Espectrais

As sobreposições espectrais são provavelmente o tipo de interferências mais problemáticas em ICP-MS. Este tipo de interferências ocorre quando um ião do analito apresenta o mesmo valor de razão massa/carga que um ião presente no plasma. [22]

> Interferências Poliatómicas ou Moleculares

São produzidas pela combinação de dois ou mais iões monoatómicos. São causadas por uma variedade de fatores, estando normalmente associadas ao plasma, ao gás nebulizador usado, aos componentes de matriz presentes na amostra, ao solvente, ao

oxigénio e ao nitrogénio proveniente de uma possível entrada do ar circundante. De modo semelhante, o argón pode formar interferências poliatómicas com alguns elementos presentes nos ácidos usados na dissolução das amostras. Por exemplo, em meio clorídrico, o $^{40}\text{Ar}^+$ combina-se com o isótopo mais abundante do cloreto na massa 35 para formar o $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$ que interfere com o único isótopo existente do arsénio na massa 75. [22]

› Óxidos, Hidróxidos, Hidretos e Espécies com Dupla Carga

Outro tipo de interferência espectral é criado por elementos existentes na amostra e que se combinam com H, ^{16}O ou ^{17}OH (proveniente da água ou do ar) para formar iões hidreto (H), óxidos (^{16}O) e hidróxidos (^{17}OH). Associadas às sobreposições de óxidos estão as interferências espectrais com dupla carga. Estas podem ser minimizadas pela otimização do caudal de gás do nebulizador e da energia de RF. Estas interferências são normalmente produzidas nas regiões mais frias do plasma, mesmo antes da interface. [22]

› Interferências isobáricas

Este tipo de interferência ocorre devido à formação de iões com a mesma razão massa/carga, mas provenientes de isótopos de elementos diferentes. [21] Como é comum encontrar-se na natureza os elementos nos seus vários isótopos, torna-se então bastante frequente encontrar no espectro iões de elementos diferentes que apresentem a mesma razão massa/carga. [23]

1.4.2.2. Interferências Não-Espetraais

As interferências não-espetrais, ou efeitos de matriz, podem ter origem em diferentes processos ou localizações: no processo de nebulização, no plasma, na região da interface ou na área das lentes. O efeito resultante é uma perda de sensibilidade nalguns elementos, isto é, uma supressão do sinal do analito. Este tipo de interferências inclui o entupimento do nebulizador, do tubo injetor da tocha, e dos cones (*sampler*) causados por uma elevada concentração de matéria dissolvida ou pela nebulização de solventes orgânicos. [24, 25]

A presença de matéria orgânica pode provocar interferências por diferenças de viscosidade entre as amostras e o solvente aspirado [22]. As diferenças de viscosidade, tensão superficial e densidade entre as amostras e as soluções de calibração, causadas por diferenças na quantidade e tipo de matéria dissolvida, tipo ou concentração de ácidos, podem produzir variações na velocidade de introdução da amostra, eficiência da

nebulização e na distribuição de partículas por tamanho do aerossol. As diferenças de temperatura entre diferentes soluções podem produzir efeitos semelhantes. O uso de uma bomba peristáltica pode reduzir os efeitos causados por diferenças na velocidade de distribuição das soluções. [24]

No plasma, as matrizes podem causar uma alteração no grau de ionização de alguns elementos, sobretudo no caso de elementos que possuem uma elevada energia de 1ª ionização, como por exemplo o Cd, Zn, As, Se, Hg, etc. Na maioria dos casos observa-se uma supressão do sinal do analito. [24]

Na região das lentes ocorre a separação de partículas com cargas positivas e negativas (iões positivos e eletrões negativos). Os iões dos elementos mais leves na presença de um elevado número de iões de elementos mais pesados vão ser mais repelidos do que na situação inversa, sofrendo deste modo mais de efeitos de matriz. [24]

1.5. Validação de um método

Para além do reconhecimento internacional da qualidade do laboratório, é importante que os métodos utilizados no mesmo sejam apropriados para solucionar o problema analítico proposto pelo cliente. Está descrito na NP EN ISO 17025:2005 que os métodos de ensaio usados em laboratórios acreditados devem ser normalizados, isto é, os métodos a serem utilizados pelo laboratório devem, numa fase inicial, ser devidamente validados, e, posteriormente, sujeitos a uma avaliação periódica, de modo a serem reconhecidos pela comunidade laboratorial nacional ou internacional [26,27]. A validação de um método de ensaio, de acordo com o mesmo documento normativo, consiste na obtenção de evidências objetivas que confirmam que esse método cumpre os requisitos específicos para uma determinada finalidade, isto é, a validação permite obter evidências acerca das principais capacidades e limitações do método quando este é aplicado em condições de rotina. [26,28]

Na validação e verificação de métodos analíticos são necessárias determinadas ferramentas de validação que se encontram inseridas nas ações de controlo de qualidade interno (CQI) e controlo de qualidade externo (CQE) de um laboratório.

O CQI depende apenas da vontade do laboratório e é referente aos procedimentos que este pode adotar de modo a monitorizar de forma contínua os resultados das medições

e avaliar se estes estão corretos. Este tipo de ferramentas incluem os materiais de referência internos, os brancos de reagente, as soluções-padrão, os ensaios de recuperação, a análise de amostras em duplicado, a elaboração de cartas de controlo e a realização de testes estatísticos. [28]

O CQE consiste nos procedimentos adotados pelo laboratório, mas cuja implementação depende de um organismo externo ao laboratório, que podem ser empregues para o mesmo propósito do CQI [28]. Aqui incluem-se a participação em ensaios de comparação interlaboratorial e a utilização de materiais de referência e de materiais de referência certificados. [29]

O processo de validação envolve o estudo de parâmetros por avaliação indireta (tais como a seletividade/especificidade, curva de calibração, linearidade, gama de trabalho, precisão e limites de quantificação e deteção) e por avaliação direta (através da análise de materiais de referência certificados e da participação em ensaios interlaboratoriais), devendo abranger as partes ou alterações cuja validação não tenha sido feita por um organismo reconhecido. [27]

1.5.1. Ferramentas usadas na validação de um método

1.5.1.1. Materiais de Referência Certificados - MRC

Os MRC devem ser usados no processo de validação de um método de ensaio, constituindo uma excelente ferramenta no controlo da qualidade de uma análise química e permitem avaliar o desempenho do laboratório. Um material de referência deve ser suficientemente estável, representativo e homogéneo, relativamente a determinadas propriedades, com uma composição química bem definida e conhecida. A periodicidade da análise dos materiais de referência certificados deve ser estipulada em função da frequência de análises efetuadas no laboratório, de estas serem de rotina ou de carácter pontual, do grau de conhecimento das amostras, da complexidade das técnicas e do grau de confiança exigido para o resultado.

Para avaliar a exatidão utilizando um MRC, os valores obtidos da análise no laboratório devem ser comparados com os valores certificados do material de referência. No caso do valor obtido não se encontrar dentro do intervalo de incerteza indicado no certificado, o laboratório deve efetuar um plano de ações corretivas de forma a detetar as causas desse desvio e tentar eliminá-las ou aceitá-las [27, 30, 31].

1.5.1.2. Ensaios Interlaboratoriais

Segundo a norma ISO/IEC 17043, um ensaio interlaboratorial corresponde à organização, realização e avaliação de ensaios no mesmo item (ou similares) por dois ou mais laboratórios respeitando condições pré-determinadas. Normalmente são regulados por organismos como o *Food Analysis Performance Assessment Scheme* (FAPAS).

Se o objetivo da participação num ensaio interlaboratorial passa pela avaliação do desempenho do laboratório pode recorrer-se a um ensaio interlaboratorial de aptidão, sendo que, em alguns países a participação nestes ensaios é condição obrigatória para obter a acreditação do laboratório. [27] Neste tipo de ensaio, os laboratórios participantes analisam um ou mais materiais idênticos, que foram fornecidos pela entidade organizadora, através de um método escolhido pelo laboratório. De seguida, é avaliada a exatidão dos resultados obtidos e, é atribuído ao laboratório um indicador numérico do seu desempenho. Geralmente, este indicador numérico é apresentado na forma de *z-score*, dado pela equação 1.2.:

$$z\text{-score} = \frac{\overline{x}_{lab} - x_{ref}}{d} \quad (\text{Equação 1.2.})$$

onde \overline{x}_{lab} corresponde ao valor obtido pelo laboratório e d é o desvio admissível, isto é, a variação máxima permitida.

Segundo a norma ISO 17043:2010, a avaliação do *z-score* em valor absoluto conduz às seguintes conclusões:

- ✓ $|z| \leq 2$, Desempenho satisfatório;
- ✓ $2 < |z| \leq 3$, Desempenho questionável;
- ✓ $|z| > 3$, Desempenho insatisfatório.

Os resultados obtidos pelo laboratório nos ensaios interlaboratoriais em que participa devem ser objeto de uma análise cuidada, de que resulta um plano de ações corretivas de forma a manter ou melhorar o desempenho do laboratório. [27, 32]

1.5.1.3. Ensaio de Recuperação

As perdas do analito a analisar ocorrem na maioria dos métodos analíticos, nomeadamente quando se realiza a sua extração de matrizes mais complexas. Consequentemente o valor resultante da medição poderá ser inferior à concentração exata

presente na amostra original. O mesmo pode acontecer em métodos com interferências de matriz, como descrito atrás no ICP-MS. Assim, a avaliação da quantidade de analito que pode ser adicionada à amostra, extraída e quantificada constitui um procedimento de validação importante. A cada amostra devem ser adicionadas diferentes concentrações de analito, de acordo com a sua concentração esperada.

A recuperação é calculada, em percentagem, através da equação 1.3.:

$$R = \frac{\bar{x}' - \bar{x}}{x_{teo}} \times 100 (\%)$$

(Equação 1.3.)

Onde:

\bar{x}' - Concentração da amostra fortificada;

\bar{x} - Concentração da amostra não fortificada;

x_{teo} - Concentração da amostra teórica. [33, 34]

1.5.1.4. Amostra diária de controlo de processo

Uma amostra diária de controlo de processo (DPCS) consiste numa amostra que é analisada num laboratório em rotina, de modo a avaliar a fiabilidade dos resultados obtidos no ensaio e, quando se pretende realizar a validação de um método de ensaio. Uma característica importante nestas amostras é o facto de serem rastreáveis a um material de referência, pois isto significa que estas amostras têm as suas características bem definidas, nomeadamente, a sua estabilidade e a concentração de analito.

Quando o resultado de uma DPCS se encontra fora dos limites estabelecidos, todos os resultados de amostras desta série de trabalho ficam suspensos até a não conformidade ser resolvida.

1.5.1.5. Testes estatísticos

É de realçar que os resultados gerados aquando da realização de análises químicas estão afetados por erros, denominados por erros sistemáticos, caso influenciem a proximidade entre os resultados gerados e o resultado considerado como verdadeiro, e por erros aleatórios se afetarem a dispersão dos resultados obtidos. [32]

Teste de Grubbs

O teste de *Grubbs* tem como objetivo detetar a presença de valores discrepantes, designados de *outliers*, nos resultados amostrais. São valores que apresentam um grande afastamento dos restantes ou são inconsistentes com estes, sendo as principais causas do aparecimento de *outliers* os erros de medição, os erros de execução e a variabilidade inerente dos elementos da população. Este teste baseia-se na diferença entre o valor discrepante e o valor da média amostral, relacionando com o desvio padrão da amostra, segundo a equação 1.4.

$$G = \frac{|x_i - \bar{x}|}{s} \quad (\text{Equação 1.4.})$$

Onde:

x_i - Valor discrepante (*outlier*)

\bar{x} - Média

s - Desvio-padrão

O valor G resultante desta equação é comparado com o valor crítico tabelado para teste de *Grubbs*, para n observações, incluindo o valor suspeito, e para a probabilidade de 95 %. Se o valor de G exceder o valor crítico, o valor discrepante é rejeitado, ou seja, trata-se de um *outlier*. [35, 36, 37]

Teste C de Cochran

O teste C de *Cochran* tem como objetivo principal a deteção de valores discrepantes, contudo também permite a avaliação da homogeneidade das variâncias. É um teste unilateral, pois verifica somente valores altos. O valor C de *Cochran* é calculado pela razão entre a maior variância e a soma de todas as variâncias das amostras, como descrito na equação 1.5.

$$C = \frac{w_{max}^2}{\sum_i^k w_i^2} \quad (\text{Equação 1.5.})$$

Onde:

w_{max}^2 - Maior variância

$\sum_i^k w_i^2$ - Somatório de todas as variâncias

O valor C obtido é comparado com o valor crítico definido na tabela de *Cochran* ($C_{Tabelado}$), sendo o valor rejeitado quando é superior ao valor crítico para o valor adequado de k matrizes e n ensaios. [35, 36]

1.5.2. Seletividade e Especificidade

A seletividade de um método analítico é a capacidade do método distinguir um analito em particular numa mistura complexa sem interferência dos outros componentes presentes na amostra (os interferentes), que são suscetíveis de causar um desvio na quantificação do analito e assim provocar desvios sistemáticos. Esta característica é essencialmente função do princípio de medida utilizado, mas depende do tipo de compostos a analisar.

A especificidade é a capacidade do método analítico em quantificar de forma correta, exclusiva e inequívoca um determinado analito relativamente a outras substâncias presentes na amostra a analisar, garantindo que a grandeza medida provém apenas do analito.

De forma a avaliar as interferências, pode-se efetuar testes de recuperação num conjunto de amostras, com a mesma matriz, onde se varia apenas a concentração do analito em proporções bem conhecidas e ao longo de toda a gama de trabalho. Neste ensaio, seleciona-se a amostra de interesse e determina-se o valor médio da concentração de analito nessa amostra, \bar{x} . De seguida, fortificam-se as mesmas amostras com uma solução com concentração de analito conhecida, x_{ad} e, determina-se o valor médio da concentração de analito na amostra após fortificação, \bar{x}' .

Um método analítico pode ser considerado específico e seletivo quando na prática, e após a realização de testes de recuperação, se verificar que as taxas de recuperação são próximas de 100%, sendo aceites valores entre 80 e 120%. Em determinadas situações é possível que este intervalo seja mais aumentado de acordo com as características do método e para outros esses intervalos podem até ser mais reduzidos. [27, 29, 38]

1.5.3. Quantificação

1.5.3.1. Curva de Calibração

A calibração, em análises quantitativas, indica um processo pelo qual a resposta de um sistema de medida se relaciona com uma concentração ou uma quantidade de substância conhecida. [27, 39]

Para aceitar uma curva de calibração devem estar definidos os seguintes critérios:

Coefficiente de correlação

O coeficiente de correlação (r) tem que ter, no mínimo, dois noes seguidos de um cinco. Pode tomar valores entre -1 e $+1$. [34]

Declive

A partir da reta de calibração é possível obter uma equação da mesma dada por equação 1.6.:

$$y = bx + a \quad \text{(Equação 1.6.)}$$

onde a e b são referentes à ordenada na origem e ao declive, respetivamente. [40]

Gama de Trabalho

A gama de trabalho corresponde ao intervalo de concentrações onde o analito pode ser determinado com precisão, justeza e linearidade através do método analítico aplicado.

Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito em estudo, dentro de uma determinada gama de trabalho. [27]

1.5.3.2. Limiars Analíticos

Existem várias formas de calcular os limiars analíticos. Estes deverão ser avaliados e atualizados sempre que o laboratório considere necessário ou em situações específicas como uma alteração de equipamento, mudança de instalações, entre outros. O limite de deteção corresponde ao teor mínimo medido, a partir do qual é possível detetar a presença do analito e o limite de quantificação estabelecem o limite inferior da curva de calibração e são calculados com base na incerteza de réplicas do branco, da incerteza dos parâmetros

da curva de calibração ou da incerteza na dispersão dos valores em torno da curva de calibração. [27]

Limite de quantificação

O limite de quantificação, LDQ, corresponde à menor concentração medida a partir da qual é possível a quantificação do analito, com uma determinada justeza e precisão. Geralmente, o LDQ corresponde à concentração do padrão mais baixo utilizado no traçado da curva de calibração. Para avaliar esta hipótese, podem realizar-se ensaios de recuperação de modo a demonstrar que este padrão corresponde ao LDQ. Para tal, fortifica-se um branco de amostra ou uma amostra que, idealmente, não deve conter o analito em estudo, ou apresente uma concentração de analito inferior ao do padrão com concentração mais baixa, de modo que a concentração de analito após fortificação seja igual ao LDQ que se pretende definir. Este ensaio deve ser realizado efetuando dez réplicas independentes e, de seguida, calcula-se a taxa de recuperação obtida para cada réplica e, por fim, a média destas. Se este valor estiver contido no intervalo de taxa de recuperação indicado na legislação para o analito em estudo, pode admitir-se que a concentração do primeiro padrão da curva de calibração corresponde ao LDQ. [27]

1.5.3.3. Sensibilidade

A sensibilidade é a capacidade de um método, ou equipamento, distinguir pequenas diferenças de concentração do analito, podendo ser definida como o quociente entre o acréscimo do valor lido ΔL e a variação da concentração ΔC correspondente a aquele acréscimo, como explícito na equação 1.7.

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\Delta L}{\Delta C} \quad (\text{Equação 1.7.})$$

Deste modo, se o modelo for linear, a sensibilidade do método será constante ao longo de toda a gama de trabalho e corresponde ao declive da curva de calibração. [27]

1.5.3.4. Gama de trabalho

Este parâmetro define-se como o intervalo de concentração de analito para o qual o método consegue dar uma resposta com um valor de precisão e justeza aceitáveis. O limite inferior da gama de trabalho, tanto no modelo linear como no modelo quadrático corresponde ao LDQ enquanto o limite superior equivale ao valor a partir do qual se começam a detetar anomalias na sensibilidade do método. [28]

1.5.4. Precisão

A precisão corresponde à concordância entre os resultados obtidos por aplicação do mesmo procedimento de ensaio várias vezes em materiais idênticos, em condições definidas. A precisão pode variar com a gama de concentrações, sendo recomendado o estudo em três níveis de concentração: baixa, intermédia e alta. Este parâmetro permite avaliar a qualidade dos resultados tendo em consideração possíveis erros aleatórios.

Existem duas medidas extremas para avaliar a dispersão dos resultados, designadas por repetibilidade e reprodutibilidade. Entre estas duas medidas extremas de precisão, existe uma avaliação que se designa por precisão intermédia. [27]

1.5.4.1. Em condições de repetibilidade

A repetibilidade representa a precisão de um método de ensaio efetuado em condições idênticas, isto é, refere-se a ensaios efetuados (normalmente nunca inferior a seis ensaios) sobre uma mesma amostra, em condições tão estáveis quanto possível, tais como o mesmo laboratório, mesmo analista, mesmo equipamento, mesmo tipo de reagentes e/ou mesmos intervalos de tempo. [27]

O limite de repetibilidade é o valor abaixo do qual se deve situar, com uma probabilidade específica, a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio, realizados nas mesmas condições. Para um nível de confiança de 95%, o limite de repetibilidade (r) é estimado segundo a Equação 1.8.

$$r = 2,8 \times s_r \quad (\text{Equação 1.8.})$$

Onde s_r é o desvio padrão da repetibilidade associada aos resultados considerados.

O coeficiente de variação de repetibilidade (CV_r), para cada nível de concentração, expresso em percentagem, é dado pela Equação 1.9.:

$$CV_r = \frac{s_r}{\bar{x}} \times 100 \quad (\text{Equação 1.9.})$$

Onde \bar{x} corresponde à média dos resultados dos ensaios realizados.

O r também pode ser expresso na forma de limite de repetibilidade relativo (CV_{r_r}) sendo este dado pela equação 1.10.: [27]

$$CV_{r_r} = 2,8 \times \frac{s_r}{\bar{x}} \times 100 (\%) \quad (\text{Equação 1.10.})$$

1.5.4.2. Em condições de precisão intermédia

A precisão intermédia refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra (ou amostras idênticas), utilizando o mesmo método e o mesmo laboratório, mas fazendo variar uma ou mais condições, tais como, análises em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Este parâmetro permite avaliar o impacto das alterações que poderão ocorrer no dia-a-dia do laboratório e é reconhecido como o mais representativo da variabilidade dos resultados do laboratório. Na maioria dos casos o valor da precisão intermédia é função da gama de concentração do ensaio, sendo o seu cálculo efetuado a partir dos resultados analíticos obtidos após a eliminação dos resultados aberrantes. [27]

Neste caso, a determinação da precisão intermédia é feita através da recolha de n valores de m ensaios de amostras ou padrões. O desvio padrão da precisão intermédia, S_i , é obtido a partir da equação 1.11.

$$S_i = \sqrt{\frac{1}{2t} \times \sum_{j=1}^t (y_{j1} - y_{j2})^2} \quad (\text{Equação 1.11.})$$

Onde:

t - Número de amostras ensaiadas;

j - Número da amostra (que vai de 1 a t amostras);

y_{j1} - Primeiro resultado obtido para a amostra j ;

y_{j2} - Segundo resultado obtido para a amostra j .

O coeficiente de variação de precisão intermédia (CV_{PI}) é dado pela equação 1.12:

$$CV_{PI}(\%) = \frac{S_i}{\bar{x}} \times 100 \quad (\text{Equação 1.12})$$

O limite de precisão intermédia (CV_{rPI}) é obtido pela equação 1.13. [27, 41]:

$$CV_{rPI}(\%) = \frac{2,8 \times S_i}{\bar{x}} \times 100 \quad (\text{Equação 1.13.})$$

1.5.5. Justeza ou veracidade

A veracidade do método corresponde à componente da incerteza dos efeitos sistemáticos. Esta componente pode ser estudada utilizando materiais de referência da

matriz, ensaios interlaboratoriais, ensaios de recuperação, entre outras ferramentas de controlo de qualidade. [27]

A justeza do método também pode ser avaliada através do cálculo da recuperação aparente (R_a). Para tal, considera-se a razão entre o \bar{x} obtido pelo laboratório na análise da amostra e a concentração do analito atribuída ao material de referência certificado, x_{ref} , como descrito na equação 1.14:

$$R_a = \frac{\bar{x}}{x_{ref}} \times 100 (\%) \quad (\text{Equação 1.14})$$

1.5.6. Incerteza de medição

Aos resultados finais das medições estão associadas incertezas que advêm de várias fontes. A NP EN ISO/IEC 17025:2005 menciona que o laboratório deverá identificar todos os componentes da incerteza baseando-se em métodos de análise apropriados. Por definição, incerteza é um parâmetro associado ao resultado de uma medição que caracteriza a dispersão de valores que se pode razoavelmente atribuir à grandeza medida e, quanto maior for a incerteza, menor será a confiabilidade do resultado. As várias fontes de incerteza são, por exemplo, amostragem, condições de armazenamento, efeitos instrumentais, pureza dos reagentes, estequiometria pressuposta, condições de medição efeitos da amostra, correções do branco, efeitos do operador, entre outros. [27]

A estimativa da incerteza é determinada tendo em conta a norma ISO 11352:2012, na qual é especificado um conjunto de procedimentos que permite aos laboratórios estimar a incerteza dos resultados utilizando uma abordagem que considera os dados de validação e controlo de qualidade dos métodos analíticos. A incerteza do método é, assim, definida mediante a conjugação de duas componentes, a componente aleatória (precisão) e a componente sistemática (justeza), que podem ser estimadas por várias abordagens. Após a seleção da abordagem, as componentes podem ser estimadas e incluídas no cálculo da incerteza que é reportada como incerteza expandida do método. [27] Neste caso, a abordagem que se aplicou foi a abordagem baseada em dados de validação.

› **Abordagem baseada em dados de validação**

Nesta abordagem a determinação da incerteza, $u_c(y)$, passa por agrupar a incerteza associada à precisão do método, de forma relativa ($u_{(precisão)relativa}$), com a incerteza associada à justeza do método, de forma relativa ($u_{(justeza)relativa}$), recorrendo à lei da propagação das incertezas como ilustrado na equação 1.15:

$$u_c(y) = \sqrt{u_{(precisão)relativa}^2 + u_{(justeza)relativa}^2} \quad (\text{Equação 1.15})$$

Assim, o primeiro passo desta abordagem passa pela determinação das componentes da $u_{(precisão)relativa}$ e da $u_{(justeza)relativa}$ separadamente. Contudo é de realçar que estas incertezas devem estar na forma de incertezas relativas de modo a poderem ser combinadas. [43]

Para o cálculo da $u_{(precisão)relativa}$ deve, numa primeira instância, determinar-se a incerteza associada à precisão intermédia na forma absoluta ($u_{precisão}$). Este valor equivale ao S_i como descrito na equação 1.11. Assim, considera-se a equação 1.16.:

$$u_{precisão} = S_i \quad (\text{Equação 1.16.})$$

De seguida, deve considerar-se a incerteza associada à precisão intermédia na forma relativa ($u_{(precisão)relativa}$) que, é equivalente ao CV_{PI} , calculado de acordo com a equação 1.12., como indicado na equação 1.17.:

$$u_{(precisão)relativa} = CV_{PI} \quad (\text{Equação 1.17.})$$

A componente da $u_{(justeza)relativa}$ pode ser calculada considerando os resultados obtidos em ensaios de recuperação. Esta componente é dada por equação 1.18.:

$$u_{(justeza)relativa} = \sqrt{(bias\ relativo)^2 + (u_{(recuperação)relativa})^2} \quad (\text{Equação 1.18.})$$

onde $u_{(recuperação)relativa}$ é referente à componente da incerteza de recuperação combinada na forma relativa.

O cálculo do *bias* relativo do ensaio de recuperação aplica-se segundo a equação 1.19.:

$$bias\ relativo\ (\%) = \frac{|\overline{[X]_{obs}} - [X]_{teo}|}{[X]_{teo}} \times 100 \quad (\text{Equação 1.19.})$$

Sendo,

$[X]_{obs}$ – Concentração de X determinada;

$[X]_{teo}$ – Concentração de X teórica.

Para determinar a $u_{(recuperação)relativa}$ deve, numa fase inicial, determinar-se a incerteza associada à concentração de analito adicionada na fortificação (u_{add}). A fortificação da amostra pode ser efetuada recorrendo a uma solução *stock* de analito presente no laboratório. Neste caso, a u_{add} deve ser calculada de acordo com o indicado pelo fabricante no certificado da solução. [43] Uma vez mais, esta incerteza deve ser convertida na forma relativa ($u_{(add)relativa}$), segundo a equação 1.20.:

$$u_{(add)relativa}(\%) = \frac{u_{add}}{C_{add}} \times 100 \quad (\text{Equação 1.20.})$$

onde C_{add} corresponde à concentração de analito adicionada no ensaio de recuperação. Para além disso, quando se determina a componente da $u_{(justeza)relativa}$ considerando os resultados obtidos nos ensaios de recuperação, deve ainda ter-se em conta a incerteza na forma relativa associada ao volume de solução de fortificação adicionado ($u_{(Vol)relativa}$). Na equação 1.21. está demonstrado como calcular este valor considerando o volume adicionado com uma micropipeta (V_{add}) e, a incerteza associada a esse volume, indicada pelo fabricante da micropipeta (u_{Vadd}). [43]

$$u_{(Vol)relativa}(\%) = \frac{u_{add}}{V_{add}} \times 100 \quad (\text{Equação 1.21.})$$

Por último, devem combinar-se a $u_{(add)relativa}$ e a $u_{(Vol)relativa}$ para determinar a $u_{(recuperação)relativa}$, tal como na equação 1.22.:

$$u_{(recuperação)relativa} = \sqrt{u_{(add)relativa}^2 + u_{(Vol)relativa}^2} \quad (\text{Equação 1.22.})$$

Por fim, calcula-se a $u_c(\mathbf{y})$ como descrito anteriormente, seguida do cálculo da U , de acordo com a equação 1.23., para determinar a incerteza do método.

$$U = k \times u_c(\mathbf{y}) \quad (\text{Equação 1.23.})$$

Onde o fator de cobertura, k, foi definido como sendo igual a 2 para um nível de confiança de 95%. [42]

Por vezes, o laboratório de análise pode avaliar a justeza utilizando mais do que uma metodologia e, quando tal acontece, deve calcular-se a $u_{(justeza)relativa}$ em todas elas e, no cálculo da incerteza do método, deve considerar-se a que tiver maior valor numérico. [43]

2. Parte Experimental

O procedimento interno PAFQ.015 – Determinação de minerais e metais por ICP estabelece a metodologia para a determinação chumbo, cádmio, mercúrio e arsénio, entre outros. Esta determinação é realizada por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), após digestão da matéria orgânica por micro-ondas com recurso a ácido nítrico, peróxido de hidrogénio, água e posterior diluição em meio aquoso. [44]

As matrizes analisadas ao longo desta validação foram as seguintes:

- ✓ Alimentos para animais (simples e compostos):
 - Alimento para gato;
 - Ração.
- ✓ Cereais, leguminosas, pseudo-cereais e derivados:
 - Cevada;
 - Cereal;
 - Biscoito;
 - Farinha de trigo;
 - Maizena 1;
 - Maizena 2;
 - Maizena 3;
 - Maizena 4.
- ✓ Frutos, algas, produtos hortícolas e derivados:
 - Alga;
 - Cacau;
 - Pasta de tomate.

2.1. Reagentes e preparação de soluções

Todos os reagentes eram de qualidade analítica (*Suprapur*) e a água era desionizada (condutividade de 0,02 μS). Dos 4 metais estudados, apenas a reta de calibração de mercúrio foi feita utilizando apenas a solução padrão individual para ICP de Hg. Para as retas de calibração dos restantes são usadas soluções de padrões mistos, incluindo outros metais.

- 2.1.1.** Soluções padrão individuais para ICP, 1000 mg/L *Certipur® - Merck*: Alumínio (Al), Antimónio (Sb), Arsénio (As), Bário (Ba), Boro (B), Cádmiu (Cd), Cálcio (Ca), Chumbo (Pb), Cobalto (Co), Cobre (Cu), Crómio (Cr), Estanho (Sn), Ferro (Fe), Fósforo (P), Magnésio (Mg), Manganês (Mn), Mercúrio (Hg), Molibdénio (Mo), Níquel (Ni), Potássio (K), Selénio (Se), Sódio (Na), Vanádio (V), Zinco (Zn).
- 2.1.2.** Hélio, $\geq 99,9999$ % - *Alpha Gaz*
- 2.1.3.** Árgon, $\geq 99,999$ % - *Alpha Gaz*
- 2.1.4.** Azoto, $\geq 99,999$ % - *Alpha Gaz*
- 2.1.5.** Ácido nítrico (HNO₃), 67-69 % – *VWR Chemicals*.
- 2.1.6.** Solução de ácido nítrico (HNO₃) 1 % (v/v): feita a partir de diluição do ácido nítrico (2.1.5.)
- 2.1.7.** Solução de ácido nítrico (HNO₃) 2 % (v/v): feita a partir de diluição do ácido nítrico (2.1.5.)
- 2.1.8.** Solução de ácido nítrico (HNO₃) 5 % (v/v): feita a partir de diluição do ácido nítrico (2.1.5.)
- 2.1.9.** Ácido clorídrico (HCl), 34-37 % (m/m) – *VWR Chemicals*.
- 2.1.10.** Solução de ácido clorídrico (HCl) 1 % (v/v): feita a partir de diluição do ácido clorídrico (2.1.9.)
- 2.1.11.** Solução auxiliar (com HNO₃ e HCl): Esta solução é utilizada na diluição dos extratos, na preparação de padrões e como solução de arraste e de limpeza do ICP-MS (2.3.5). Deve ser preparada diariamente.
- 2.1.12.** Solução de conservação dos padrões de mercúrio (HCl) 12 % (v/v): Esta solução é utilizada para preservar as soluções padrão intermédias de mercúrio. Deve ser preparada e utilizada no dia da preparação destas soluções.
- 2.1.13.** Ácido cítrico anidro (C₆H₈O₇), $\geq 99,5$ % - *VWR Chemicals*.
- 2.1.14.** Solução de ácido cítrico: Pesar 0,24g de ácido cítrico (2.1.13). Transferir para um balão volumétrico de 1000 mL, adicionar 600 mL de solução auxiliar (2.1.11) e homogeneizar. Esta solução é utilizada para preparar a reta de calibração de arsénio e selénio. Deve ser preparada sempre que for necessária, e rejeitada após o uso.
- 2.1.15.** *Tuning solution for Agilent 7800* (Ce, Co, Li, Tl, Y), 10 µg/L. - *Agilent*
- 2.1.16.** Mistura de padrões internos, *Internal standard kit* (Ge, Ir, Rh, Sc), 20 mg/kg - *Agilent*

- 2.1.17.** Solução de mistura de padrões internos de 400 µg/kg: Esta solução é utilizada para infundir por um canal específico (ISTD) a mistura de padrões internos no equipamento. Esta solução tem validade de um mês quando conservada à temperatura ambiente e foi preparada a partir de diluição da mistura de padrões internos 20 mg/kg (2.1.16.).
- 2.1.18.** Peróxido de hidrogénio (H₂O₂) 30 %, *Suprapur* ou equivalente *VWR Chemicals*.

Soluções de mercúrio preparadas por diluição rigorosa:

- 2.1.19.** Solução padrão intermédia de mercúrio (Hg), 100 mg/L: Esta solução tem validade de um mês, quando conservada em condições de refrigeração.
- 2.1.20.** Solução padrão intermédia de mercúrio (Hg), 10,0 mg/L: Esta solução tem validade de um mês, quando conservada em condições de refrigeração.
- 2.1.21.** Solução padrão intermédia de mercúrio (Hg), 1,00 mg/L: Esta solução tem validade de um mês, quando conservada em condições de refrigeração.
- 2.1.22.** Solução mãe de calibração de mercúrio (Hg), 50,0 µg/L: Esta solução deve ser preparada e utilizada no dia da realização das soluções de calibração do mercúrio (2.1.24).
- 2.1.23.** Soluções de calibração de mercúrio (Hg): preparadas a partir da solução mãe de calibração de Hg por diluição com a solução auxiliar (2.1.11.), como descrito na tabela 2.1. Estas soluções devem ser preparadas e utilizadas no dia da realização do ensaio.

Tabela 2.1 - Preparação das soluções de calibração de mercúrio [44]

Padrão	Solução Inicial	Volume Inicial (mL)	Volume Final (mL)	Concentração final (µg/L)
Hg4		8,0		4,0
Hg3	Hg*	3,0	100	1,5
Hg2		1,0		0,50
Hg1	Hg4	1,0		0,040
Hg0	Solução auxiliar (2.1.11.)			0

* solução Hg 50 µg/L

Soluções de arsénio e selénio:

2.1.24. Solução padrão conjunta de arsénio e selénio (AsSe): Esta solução tem validade de um mês, quando conservada em condições de refrigeração

2.1.25. Solução mãe de calibração de As e Se: Esta solução não pertence à curva de calibração. É utilizada para preparar as soluções de calibração. Deve ser preparada e utilizada no dia da realização das soluções de calibração do arsénio e do selénio (2.1.26).

2.1.26. Soluções de calibração de arsénio e selénio:

Preparar 5 soluções de calibração por diluição da solução mãe de calibração de arsénio e selénio, na solução de ácido cítrico (2.1.14), conforme indicado na tabela 2.2. Pipetar os volumes indicados para balões volumétricos de 100 mL. Estas soluções devem ser preparadas e utilizadas no dia da realização do ensaio.

Tabela 2.2 - Preparação das soluções de calibração de Arsénio e Selénio [44]

Padrão	Solução Inicial	Volume Inicial (mL)	Volume Final (mL)	Concentração final (µg/L)
AsSe5	AsSe*	10,0		100
AsSe4		10,0		10,0
AsSe3	AsSe5	4,00	100	4,00
AsSe2		4,00		0,400
AsSe1	AsSe4	2,00		0,200
AsSe0	Solução de ácido cítrico (2.1.14.)			0

* Solução mãe de calibração de As e de Se (2.1.25.)

Chumbo e cádmio

2.1.27. Solução padrão conjunta de cádmio e chumbo de 10,0 mg/L: Esta solução tem validade de um mês, quando conservada em condições de refrigeração.

2.1.28. Soluções de calibração de chumbo e cádmio (também incluem os restantes elementos uma vez que se trata de soluções padrão mistas):

Preparar 7 soluções de calibração por diluição na solução auxiliar (2.1.11), conforme indicado na tabela 2.3. Pipetar os volumes indicados para balões volumétricos de 100 mL. Estas soluções devem ser preparadas e utilizadas no dia da realização do ensaio.

Tabela 2.3 - Preparação das soluções de calibração de Al, Sb, Ba, B, Cd, Ca, Pb, Co, Cu, Cr, Sn, Fe, P, Mg, Mn, Mo, Ni, K, Na, V, Zn [44]

Padrão	Solução Inicial ($\mu\text{g/L}$)	Volume Inicial (mL)	Volume Final (mL)
P7	P8	25	100
P6		10	
P5	P7	10	
	PbCd*	1	
P4	P5	10	
P3	P5	4	
P2	P4	4	
P1	P3	1	
P0	Solução auxiliar (2.1.11.)		

* Solução padrão conjunta de cádmio e chumbo de 10,0 mg/L

As concentrações dos elementos de interesse (chumbo e cádmio) em cada padrão encontram-se discriminadas na tabela 2.4.

Tabela 2.4 - Concentração, em $\mu\text{g/L}$, de Pb e Cd em cada padrão de calibração.

Analito	Concentração ($\mu\text{g/L}$)								
	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
Pb	0,00	0,0400	0,400	4,00	10,0	100	0,00	0,00	0,00
Cd	0,00	0,0400	0,400	4,00	10,0	100	0,00	0,00	0,00

2.2. Equipamentos e Utensílios

- › Sistema de digestão por micro-ondas - *Milestone Ultrawave SCR (Single Reaction Chamber)*, representado na figura 2.1.



Figura 2.1 - Sistema de digestão por micro-ondas

- › *Chiller*, acoplado ao sistema de digestão por micro-ondas, regulável a uma temperatura de 18°C - *Labtech*
- › Espetrómetro de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS), equipado com amostrador automático - 7800 ICP-MS da *Agilent*
- › *Chiller*, acoplado ao ICP-MS, regulável a uma temperatura de 20°C - *Agilent*
- › Tubos de quartzo de 15 mL, 16 mm Ø x 130 mm, usados no sistema de digestão – *VWR Chemicals*, como representado na figura 2.2.



Figura 2.2 – Carrossel com tubos de quartzo usados no sistema de digestão

- › Tampas de *teflon* de 16 mm Ø.
- › Banho de ultrassons – *VWR Chemicals*
- › Estufa de secagem, regulável a uma temperatura aproximada de 140°C. – *MMM Group*. [44]

2.3. Procedimento para tratamento e análise de amostras e soluções

2.3.1. Digestão por Micro-ondas

O equipamento de digestão utilizado tem alto desempenho e opera com pressões máximas de 199 bar e temperaturas máximas de 300 °C, assegurando a digestão das amostras mais difíceis, com um controlo de pressão e temperatura da câmara de digestão de 20 vezes por segundo, para ajuste da potência de micro-ondas instantaneamente, garantindo maior segurança no processo de digestão, em particular nas reações mais exotérmicas. O procedimento experimental foi o seguinte:

- ✓ Pesar para o fundo de um tubo de quartzo, como representado na figura 2.2., uma toma de amostra de acordo com o indicado na tabela 2.5.

Tabela 2.5 - Massas da toma, em g, a pesar para cada tipo de matriz [44]

Matriz	Massa da toma (g)
Sólida	0,2-0,5
Com elevado teor de água (p.e. pescado, leite, sumo)	1
Com elevado teor de gordura (p.e. azeite, margarina, banha, óleos)	0,3

- ✓ Na *hotte* dispensar ao longo das paredes do tubo de modo a arrastar resíduos de amostra: 1 mL de água, 1 mL de H₂O₂ (2.1.18), 3 mL de HNO₃ (2.1.5).
- ✓ Agitar cuidadosamente, tapar e colocar o tubo no carrossel.
- ✓ Ligar o equipamento presente na figura 2.1.
- ✓ Ligar o *chiller*.
- ✓ Abrir a corrente de azoto.
- ✓ Na *hotte*, medir para o vaso de reação PTFE do micro-ondas, demonstrado na figura 2.3., 130 mL de água e 5 mL de ácido nítrico (2.1.5).



Figura 2.3 - Vaso de reação PTFE do micro-ondas [44]

- ✓ Colocar o vaso de reação PTFE na cavidade metálica do reator.
- ✓ Encaixar o carrossel no suporte.
- ✓ Iniciar a digestão.
- ✓ Aquando do término da digestão, na *hotte*, transferir as soluções ácidas para balões volumétricos de 50 mL.
- ✓ Lavar o tubo com água e transferir as águas de lavagem para o balão volumétrico.
- ✓ Perfazer o volume com água e homogeneizar.
- ✓ Retirar o vaso de reação PTFE e rejeitar a solução. [44]

Ensaio em Branco

Diariamente efetuar paralelamente um ensaio em branco. Este deverá ser feito pela digestão de 1 mL de água, 1 mL de H₂O₂ e de 3 mL de HNO₃. A posição deste tubo deverá ser alternada de modo a poder ser realizada em cada uma das posições do carrossel. O sinal obtido deverá ser menor ou igual a metade do sinal obtido do padrão de menor concentração de cada um dos elementos. [44]

2.3.2. Análise por ICP-MS

A otimização instrumental inicial é automaticamente efetuada com a solução de *Tuning* (2.1.15.). A otimização instrumental tem como objetivo atingir as condições instrumentais necessárias para garantir as condições apropriadas à realização de uma análise. Esta otimização instrumental compreende a calibração, otimização e verificação dos seguintes parâmetros:

- ✓ Resolução de três massas que cobrem a gama de massas analíticas;
- ✓ Forma do pico e a possível contaminação com massas vizinhas;
- ✓ Contagens para as massas que cobrem a gama de massas analíticas;
- ✓ Variabilidade das contagens para massas que cobrem a gama de massas analíticas;
- ✓ Relação indicadora da formação de óxidos;

- ✓ Relação indicadora da formação de duplas cargas

Depois de finalizada a otimização dos parâmetros mencionados, são gerados dois relatórios, o *Performance Report* e o *Tune Report*. Nestes relatórios são apresentados os resultados obtidos para a otimização dos parâmetros de inicialização do equipamento. Um exemplo de cada um dos relatórios encontra-se no Anexo B. Os critérios de aceitação para estes parâmetros encontram-se descritos abaixo.

- **Resolução**

- ✓ Massa 7: Eixo 6,90 – 7,10
- ✓ Massa 89: Eixo 88,9 – 89,1
- ✓ Massa 205: Eixo 205 – 205,1
- ✓ W-10%: 0,600 – 0,900 (para todas as massas)

- **Sensibilidade – *Performance Report***

- ✓ 1000 contagens < Massa 7 < 25000 contagens
- ✓ 5000 contagens < Massa 89 < 50000 contagens
- ✓ 5000 contagens < Massa 205 < 60000 contagens

- **Sensibilidade – *Tune Report***

- ✓ 1000 contagens < ^{59}Co < 10000 contagens
- ✓ 1000 contagens < ^{89}Y < 10000 contagens
- ✓ 5000 contagens < 205 Tl < 50000 contagens
- ✓ $\text{RSD} \leq 5\%$ (para as massas 7, 89, 205)
- ✓ Relação de óxidos < 1,5 %
- ✓ Relação de duplas cargas < 2,5%

É necessário ter também atenção à forma dos picos do sinal: picos com “deformações” no topo indicam sujidade no nebulizador e/ou nos cones devendo por isso proceder-se à sua limpeza. Uma vez realizadas estas operações o equipamento estará pronto a ser utilizado para a análise das soluções (padrões e/ou amostras), desde que todos os parâmetros estiverem dentro do critério estabelecido. Caso contrário é necessário iniciar novamente todo o processo com a solução de *tunning*. [49]

O sistema de aquisição e tratamento de dados do equipamento ajusta uma equação através de uma regressão linear, interpola os valores obtidos para a amostra na curva de calibração correspondente e apresenta os resultados expressos por $\mu\text{g}/\text{kg}$, aplicando a equação 2.1 e equação 2.2, em que m é a massa da toma da amostra.

$$\text{Metal } (\mu\text{g}/\text{kg}) = \text{Resultado da interpolação } (\mu\text{g}/\text{L})$$

$$\times \frac{\text{Fator de diluição}(\text{mL})}{m \text{ (g)}}$$

(Equação 2.1.)

Os resultados são expressos em mg/kg, segundo.:

$$\text{Metal } (\text{mg}/\text{kg}) = \frac{\text{Metal } (\mu\text{g}/\text{kg})}{1000}$$

(Equação 2.2.)

3. Apresentação e discussão dos resultados

Foram realizados os ensaios necessários e pertinentes para cada um dos seguintes critérios: precisão (repetibilidade e precisão intermédia), justeza, limites de quantificação, linearidade, gama de trabalho, seletividade/especificidade e incerteza. Na tabela 3.1. está representado um resumo dos principais resultados obtidos.

Tabela 3.1 – Resumo dos principais resultados obtidos: intervalo de trabalho (mg/kg), coeficiente de correlação, nível de avaliação de desempenho (mg/kg), limite de repetibilidade relativo, CV_r (%), o limite de precisão intermédia relativo, CV_{rPI} (%), z-score, a taxa de recuperação e a incerteza relativa, U, em %.

Metal	Gama de trabalho (mg/kg)	Coef. de correlação	Nível de avaliação de desempenho (mg/kg)		Cv _r (%)	Cv _{rPI} (%)	z-score	R (%)	U (%)
			< 0,10	> 0,60					
As	0,020 – 5,0	1,0	< 0,10	> 0,60	15	12	< 2	92,2	15
			0,10 – 0,60	> 0,60	17	5,9			24
			> 0,60	> 0,60	7,0	5,4			24
Cd	0,0050 – 2,0	1,0	< 0,10	> 0,50	11	10	< 2	100,8	17
			0,10 – 0,50	> 0,50	6,0	6,0			16
			> 0,50	> 0,50	8,0	4,6			15
Hg	0,0050 – 1,5	0,99	< 0,10	> 0,30	24	13	< 2	90,3	23
			0,10 – 0,30	> 0,30	15	12			24
			> 0,30	> 0,30	17	12			19
Pb	0,0050 – 2,0	1,0	< 0,10	> 0,40	12	11	< 2	92,4	16
			0,10 – 0,40	> 0,40	7,9	9,7			16
			> 0,40	> 0,40	8,6	6,4			17

Nos próximos subcapítulos será feita uma análise detalhada de cada um destes resultados.

3.1. Linearidade

A validação interna do método analítico para a quantificação do teor de chumbo, cádmio, mercúrio e arsénio em amostras alimentares iniciou-se com o traçado de retas de calibração. As retas de calibração foram traçadas em dias diferentes, aquando da utilização do ICP-MS. Assim, foram recolhidos os valores dos declives obtidos para as

curvas de calibração realizadas, como ilustrado na tabela 3.2., estando estas representadas no Anexo C.

Tabela 3.2 - Declives das retas de calibração traçadas para cada metal.

Reta	Declive			
	Arsénio	Cádmio	Mercúrio	Chumbo
1	$5,964 \times 10^{-4}$	$1,288 \times 10^{-3}$	$3,358 \times 10^{-3}$	$3,409 \times 10^{-2}$
2	$5,266 \times 10^{-4}$	$1,278 \times 10^{-3}$	$3,213 \times 10^{-3}$	$3,310 \times 10^{-2}$
3	$5,158 \times 10^{-4}$	$1,251 \times 10^{-3}$	$3,307 \times 10^{-3}$	$3,374 \times 10^{-2}$
4	$4,953 \times 10^{-4}$	$1,282 \times 10^{-3}$	$3,202 \times 10^{-3}$	$3,345 \times 10^{-2}$
5	$5,512 \times 10^{-4}$	$1,315 \times 10^{-3}$	$3,681 \times 10^{-3}$	$3,367 \times 10^{-2}$

Sabe-se que a sensibilidade de um método que segue um modelo de regressão linear pode ser avaliada através do declive da reta de calibração, e, por este motivo, o controlo dos declives também permitiu verificar se a sensibilidade do método se mantinha constante ao longo tempo. Determinou-se o valor médio dos declives e o respetivo desvio padrão e, a partir destes dois valores, obteve-se o coeficiente de variação de 6,5%, 1,6%, 5,2% e 1,0% para o arsénio, cádmio, mercúrio e chumbo, respetivamente. De acordo com o definido internamente pelo laboratório, os resultados são considerados satisfatórios se o coeficiente de variação for inferior a 10 %. Como tal foi verificado, concluiu-se que a sensibilidade do método não é alterada ao longo do tempo.

A linearidade é avaliada através da representação gráfica da função, do cálculo e análise do coeficiente de correlação de, pelo menos, 5 curvas de calibração. A curva de calibração é aceite desde que o coeficiente de correlação tenha, no mínimo, dois noventa e cinco seguidos de um cinco (0,995) e desde que a sua representação gráfica seja uma reta.

O coeficiente de correlação de cada reta encontra-se descrito na tabela 3.3., bem como a média, desvio padrão e coeficiente de variação.

Tabela 3.3 - Média, desvio padrão e coeficiente de variação dos coeficientes de correlação (r) obtidos das retas de calibração de arsénio, cádmio, mercúrio e chumbo.

Metal	Coeficiente de correlação (r)		
	Média	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)
Arsénio	1,000	0,000050	0,0050
Cádmio	1,000	0,00000	0,000
Mercúrio	0,9991	0,00060	0,060
Chumbo	1,000	0,000090	0,0090

Com base nos ensaios realizados e nos resultados obtidos, demonstra-se que existe linearidade uma vez que o $r \geq 0,995$, a representação gráfica da função é uma reta e os coeficientes de variação são inferiores a 10%.

3.2. Limite de quantificação

O limite de quantificação foi estabelecido num outro laboratório do grupo, no entanto procedeu-se à validação experimental do mesmo através de ensaios de recuperação, com adição de analito, de concentração idêntica à do primeiro padrão da curva de calibração, a uma amostra. Considerando-se entre 3 e 7 ensaios da matriz Maizena, obtiveram-se os resultados apresentados na tabela 3.4., de acordo com os exemplos de cálculo apresentados no Anexo D. É de salientar que os resultados apresentados apenas se referem à matriz mencionada.

Tabela 3.4 - Limite de quantificação, em mg/kg, e respetiva validação, tendo em conta a taxa de recuperação, em %, para cada metal

Metal	LDQ (mg/kg)	Nº ensaios	Resultado médio do ensaio em branco (mg/kg)	Resultado teórico médio (mg/kg)	Resultado obtido médio (mg/kg)	\bar{R} (%)
Arsénio	0,020	7	0,000	0,020	0,020	97
Cádmio	0,005	7	0,000	0,0050	0,0050	109
Mercúrio	0,005	4	0,000	0,0050	0,0060	112
Chumbo	0,005	3	0,0030	0,0050	0,0080	96

Uma vez que na validação do LDQ para cada metal, os resultados obtidos estão de acordo com o limite estabelecido e a taxa de recuperação para cada um se encontra dentro do intervalo 80-120%, considerou-se, assim, que o limite de quantificação

estabelecido de 0,020 mg/kg para o arsénio e de 0,0050 mg/kg para cádmio, mercúrio e chumbo, para a matriz maizena, é aceitável.

3.3. Gama de trabalho

Tal como foi referido anteriormente, o limite inferior de trabalho corresponde ao LDQ. O limite superior foi definido tendo em conta o valor mais elevado obtido na análise das amostras das diversas matrizes em condições de repetibilidade. Posto isto, a gama de trabalho definida para cada metal encontra-se na tabela 3.5.

Tabela 3.5 - Gama de trabalho, em mg/kg

Elemento	De (mg/kg)	Até (mg/kg)
Arsénio	0,020	5,0
Cádmio	0,0050	2,0
Mercúrio	0,0050	1,5
Chumbo	0,0050	2,0

A título de exemplo pode-se observar na tabela E.1 do Anexo E que o resultado mais elevado obtido para chumbo foi de 1,8 mg/kg para a matriz ração, tendo-se definido o limite superior em 2,0 mg/kg.

3.4. Precisão

3.4.1. Repetibilidade

Para demonstração da repetibilidade usaram-se os resultados dos replicados obtidos da análise das matrizes identificadas no capítulo 2 realizados no mesmo dia.

> **Chumbo**

Determinaram-se os valores médios da concentração de chumbo, o desvio padrão da repetibilidade e a variância de repetibilidade para cada uma das matrizes, considerando os 7 ensaios realizados para cada uma delas, com exceção da matriz maizena 3 em que foram considerados 10 ensaios, e registaram-se os resultados na tabela 3.6.

Tabela 3.6 - Valores médios da concentração de chumbo, o desvio padrão da repetibilidade e a variância da repetibilidade para cada matriz, em mg/kg.

Matriz	$\overline{[Pb]}$ (mg/kg)	s_r (mg/kg)	S^2 (mg/kg) ²
Alimento para gato	1,4	0,062	0,0038
Ração	1,8	0,056	0,0031
Cevada	0,10	0,0024	0,0000
Cereal	0,025	0,0016	0,0000
Biscoito	0,13	0,0025	0,0000
Farinha de trigo	0,058	0,0016	0,0000
Maizena 1	0,93	0,014	0,00020
Maizena 2	0,45	0,014	0,00020
Maizena 3	0,014	0,021	0,00040
Maizena 4	0,095	0,0033	0,0000
Alga	0,15	0,0044	0,0000
Cacau	0,28	0,0090	0,00010
Pasta de tomate	0,22	0,0081	0,00010

Para cada matriz, foi realizado o teste de *Grubbs*, como indicado na tabela E.2, para avaliar a possibilidade de se rejeitar algum valor da concentração de chumbo determinada para os replicados. Como o valor de G tabelado para $n = 7$ e, 95 % de confiança é de 2,1 e, o valor máximo de G calculado foi de 1,8, para a matriz cacau, concluiu-se que nenhum dos valores considerados suspeitos deve ser rejeitado para o cálculo da repetibilidade do método. No entanto, para a matriz maizena 3, com $n=10$, o valor de G tabelado é de 2,5 e o valor máximo de G calculado foi de 2,8. Uma vez que o valor calculado é superior ao valor tabelado rejeitou-se esta matriz para o cálculo da repetibilidade do método.

Com o intuito de avaliar a necessidade de eliminar alguma matriz para o cálculo da repetibilidade do método, a partir dos valores da variância de repetibilidade determinados anteriormente, realizou-se um teste de *Cochran*, como indicado na tabela E.3. O mesmo cálculo foi sucessivamente realizado até que não fosse necessário eliminar mais nenhuma matriz.

No entanto, ao invés de se eliminarem as matrizes e se determinar a repetibilidade do método para a gama de trabalho estabelecida, dividiu-se a mesma em três níveis de concentrações e, para cada uma delas, determinou-se não só a repetibilidade como também a precisão intermédia e a incerteza do método.

Exemplificando com o chumbo, o nível mais baixo consistiu nas concentrações inferiores a 0,10 mg/kg, o seguinte nível intermédio, de $0,10 \leq [\text{Chumbo}] \leq 0,40$ mg/kg e por último, o nível alto de $[\text{Chumbo}] > 0,40$ mg/kg. O critério de separação da gama de trabalho principal nestes níveis foi aquele que permitiu uma menor rejeição de matrizes para o estudo da repetibilidade e, considerou no mínimo, três matrizes por cada nível de trabalho.

- **[Chumbo] < 0,10 mg/kg**

Assim, para o intervalo de trabalho de concentração inferior a 0,10 mg/kg, foram consideradas 3 matrizes, como ilustrado na tabela 3.7., sendo que para cada uma delas foi determinado o valor médio da concentração de chumbo, o desvio padrão de repetibilidade e a variância de repetibilidade.

Tabela 3.7 - Valores auxiliares necessários para o estudo da precisão em condições de repetibilidade do método, nomeadamente o valor médio da concentração de chumbo nas matrizes consideradas, [Pb] (mg/kg), o desvio padrão de repetibilidade, s_r (mg/kg) e a variância, s^2 (mg/kg), para [Pb] < 0,10 mg/kg.

Matriz	$\overline{[\text{Pb}]}$ (mg/kg)	s_r (mg/kg)	S^2 (mg/kg)²
Cereal	0,025	0,0016	0,00000
Farinha de trigo	0,058	0,0016	0,00000
Maizena	0,095	0,0033	0,000010

Após realização do teste de *Cochran*, verificou-se que para a matriz que apresentava maior variância, isto é, a maizena, o valor de C calculado foi de 0,59. Como o valor de C tabelado para $n = 7$, $k = 3$ e, 95 % de confiança é de 0,68, concluiu-se que esta matriz não deveria ser rejeitada para o estudo da repetibilidade e, como tal, foram consideradas as 3 matrizes mencionadas. Deste modo, determinou-se o valor médio do desvio-padrão (s_r), sendo este igual a 0,0022 mg/kg, bem como os valores do coeficiente de variação de repetibilidade (CV_r), do limite de repetibilidade (r) e do limite de repetibilidade relativo ($CV_{r,r}$), os respetivos valores médios, como apresentado na tabela 3.8., para este nível de trabalho.

Tabela 3.8 - Valores do coeficiente de variação de repetibilidade (CVr), em %, do limite de repetibilidade (r), em mg/kg, e do limite de repetibilidade relativo (CVr_r), em %, obtidos para cada matriz considerada no estudo da repetibilidade para o nível [Pb] < 0,10 mg/kg.

Matriz	CVr (%)	r (mg/kg)	CVr _r (%)
Cereal	6,4	0,0044	18
Farinha de trigo	2,8	0,0045	7,8
Maizena	3,5	0,0094	9,9
Média	4,3	0,010	12

- **0,10 ≤ [Chumbo] ≤ 0,40 mg/kg**

Assim, para o nível de trabalho compreendido entre 0,10 e 0,40 mg/kg, foram consideradas 5 matrizes, como ilustrado na tabela 3.9., sendo que para cada uma delas foi determinado o valor médio da concentração de chumbo, o desvio padrão de repetibilidade e a variância de repetibilidade.

Tabela 3.9 - Valores auxiliares necessários para o estudo da precisão em condições de repetibilidade do método, nomeadamente o valor médio da concentração de chumbo nas matrizes consideradas, [Pb] (mg/kg), o desvio padrão de repetibilidade, s_r (mg/kg) e a variância, s² (mg/kg), no nível de 0,10 ≤ [Pb] ≤ 0,40 mg/kg.

Matriz	$\overline{[Pb]}$ (mg/kg)	s _r (mg/kg)	S ² (mg/kg) ²
Cevada	0,10	0,0024	0,0000
Biscoito	0,13	0,0025	0,000010
Alga	0,15	0,0044	0,000020
Cacau	0,28	0,0090	0,000080
Pasta de tomate	0,22	0,0081	0,000070

Após realização do teste de Cochran, verificou-se que para a matriz que apresentava maior variância, isto é, o cacau, o valor de C calculado foi de 0,45. Como o valor de C tabelado para n = 7, k = 5 e 95 % de confiança é de 0,48, concluiu-se que esta matriz não deveria ser rejeitada para o estudo da repetibilidade e, como tal, foram consideradas as 5 matrizes mencionadas.

Determinou-se o valor médio do s_r sendo este igual a 0,0053 mg/kg, bem como os valores do CVr, do r e do CVr_r e os respetivos valores médios, como apresentado na tabela 3.10., para este nível de trabalho.

Tabela 3.10 - Valores do coeficiente de variação de repetibilidade (CVr), em %, do limite de repetibilidade (r), em mg/kg, e do limite de repetibilidade relativo (CVr_r), em %, obtidos para cada matriz considerada no estudo da repetibilidade para o nível 0,10 ≤ [Pb] ≤ 0,40 mg/kg.

Matriz	CVr (%)	r (mg/kg)	CVr _r (%)
Cevada	2,4	0,0068	6,8
Biscoito	1,9	0,0071	5,3
Alga	2,9	0,012	8,2
Cacau	3,2	0,025	9,0
Pasta de tomate	3,7	0,023	10
Média	2,8	0,010	7,9

- **[Chumbo] > 0,40 mg/kg**

Por último, realizou-se o mesmo estudo para o nível [Chumbo] > 0,40 mg/kg. Para tal, foram consideradas 4 matrizes, como ilustrado na tabela 3.11., sendo que para cada uma delas foi determinado o valor médio da concentração de chumbo, o desvio padrão de repetibilidade e a variância de repetibilidade.

Tabela 3.11 - Valores auxiliares necessários para o estudo da precisão em condições de repetibilidade do método, nomeadamente o valor médio da concentração de chumbo nas matrizes consideradas, [Pb] (mg/kg), o desvio padrão de repetibilidade, s_r (mg/kg) e a variância, s² (mg/kg), para [Pb] > 0,40 mg/kg.

Matriz	$\overline{[Pb]}$ (mg/kg)	s _r (mg/kg)	S ² (mg/kg) ²
Alimento para gato	1,4	0,062	0,0038
Semente	1,8	0,056	0,0031
Maizena 1	0,93	0,014	0,00020
Maizena 2	0,45	0,014	0,00020

Após realização do teste de Cochran, verificou-se que para a matriz que apresentava maior variância, isto é, o alimento para gatos, o valor de C calculado foi de 0,52. Como o valor de C tabelado para n = 7, k = 4 e, 95 % de confiança é de 0,56, concluiu-se que esta matriz não deveria ser rejeitada para o estudo da repetibilidade e, como tal, foram consideradas as 4 matrizes mencionadas.

Sendo o valor médio do s_r igual a 0,036 mg/kg, determinou-se os valores do CVr, do r e do CVr_r, bem como os respetivos valores médios, como apresentado na tabela 3.12., para este nível de trabalho.

Tabela 3.12 - Valores do coeficiente de variação de repetibilidade (CVr), em %, do limite de repetibilidade (r), em mg/kg, e do limite de repetibilidade relativo (CVr_r), em %, obtidos para cada matriz considerada no estudo da repetibilidade para o nível [Pb]>0,40 mg/kg.

Matriz	CVr (%)	r (mg/kg)	CVr_r (%)
Alimento para gato	4,5	0,17	13
Semente	3,0	0,16	8,5
Maizena 1	1,5	0,040	4,3
Maizena 2	3,1	0,039	8,7
Média	3,1	0,10	8,6

Analysaram-se os resultados obtidos relativos à média do limite de repetibilidade, do limite de repetibilidade relativo e dos coeficientes de variação relativos, para cada nível de trabalho, estando esta análise representada na tabela 3.13.

Tabela 3.13 - Valores do coeficiente de variação de repetibilidade (CV_r), do limite de repetibilidade (r) e, do limite de repetibilidade relativo (CVr_r) obtidos para o chumbo.

Metal	Nível (mg/kg)	CV_r (%)	r (mg/kg)	CVr_r (%)
Chumbo	< 0,100	4,3	0,010	12
	0,10 – 0,399	2,8	0,010	7,9
	> 0,40	3,1	0,10	8,6

De acordo com o definido pelo laboratório, a repetibilidade pode ser considerada satisfatória se o CV_r for inferior a 10 %, o que se verificou para os diferentes níveis de trabalho.

É importante realçar que os valores obtidos, através da análise dos replicados, tanto para o limite de repetibilidade como para o limite de repetibilidade relativo, definem critérios de aceitação para ensaios que poderão ser realizados em duplicado. Isto é, valores obtidos em duplicado, em condições de repetibilidade podem ser aceites se a diferença entre eles não exceder os 0,010 mg/kg para os dois primeiros intervalos de trabalho e para o 3º intervalo não pode exceder 0,10 mg/kg. Contudo, dado que o nível de trabalho ainda é extenso e o valor absoluto pode induzir em erro a eliminação de duplicados, ao invés de se considerar o r como critério de aceitação de diferença entre duplicados obtidos em condições de repetibilidade considera-se o CVr_r, isto é, aceitam-se duplicados se a

diferença entre eles não for superior a 12 %, 7,9 % e 8,6 % do seu valor médio para o 1º, 2º e 3º intervalos, respetivamente.

› **Arsénio, cádmio, mercúrio**

Para os restantes metais realizou-se o tratamento de resultados das condições de repetibilidade de forma idêntica ao apresentado para o chumbo. Posto isto, os resultados relativos aos mesmos encontram-se descritos na tabela 3.14.

Tabela 3.14 - Valores do coeficiente de variação de repetibilidade (CV_r), do limite de repetibilidade (r) e, do limite de repetibilidade relativo (CV_{r,r}) obtidos para cada metal.

Metal	Nível (mg/kg)	CV_r (%)	r (mg/kg)	CV_{r,r} (%)
Arsénio	< 0,100	5,5	0,010	15
	0,100 – 0,59	6,0	0,040	17
	≥ 0,60	2,5	0,12	7,0
Cádmio	< 0,100	4,0	0,0030	11
	0,100 – 0,599	2,0	0,010	6,0
	≥ 0,60	3,0	0,11	8,0
Mercúrio	< 0,100	9,0	0,0040	24
	0,100 – 0,299	5,5	0,030	15
	≥ 0,300	6,0	0,15	17

› **Arsénio**

Foram definidos 3 níveis de trabalho. O nível mais baixo consistiu nas concentrações inferiores a 0,10 mg/kg, o nível intermédio, de $0,10 \leq [\text{Arsénio}] \leq 0,59$ mg/kg e por último, o nível alto de $[\text{Arsénio}] > 0,60$ mg/kg.

Concluiu-se que o método, no primeiro nível de trabalho, $[\text{Arsénio}] < 0,10$ mg/kg, apresenta, em média, um CV_r de 5,5%, um r de 0,010 mg/kg e um CV_{r,r} igual a 15 %. No segundo nível de trabalho, $0,10 \leq [\text{Arsénio}] \leq 0,59$ mg/kg, apresenta, em média, um CV_r de 6,0%, um r de 0,040 mg/kg e um CV_{r,r} igual a 17 %. Por fim, no terceiro nível de

trabalho, [Arsénio] $\geq 0,60$ mg/kg, apresenta, em média, um CV_r de 2,5%, um r de 0,12 mg/kg e um CV_r igual a 7,0 %.

De acordo com o definido pelo laboratório, a repetibilidade pode ser considerada satisfatória se o CV_r for inferior a 10 %, garantindo que os desvios observados em análises efetuadas em condições de repetibilidade não afetam a confiança nos resultados produzidos. Posto isto, verificou-se que a repetibilidade do método para os três níveis de trabalho foi satisfatória.

Para além disso, ficou definido que valores obtidos em duplicado, em condições de repetibilidade, podem ser aceites se a diferença entre eles não exceder os 0,0030 mg/kg, 0,010 mg/kg e 0,11 mg/kg para o 1º, 2º e 3º níveis, respetivamente. Contudo, dado que a gama de trabalho ainda é extensa e o valor absoluto pode induzir em erro a eliminação de duplicados, ao invés de se considerar o r como critério de aceitação de diferença entre replicados obtidos em condições de repetibilidade considerou-se o CV_r, isto é, aceitam-se duplicados se a diferença entre eles não for superior a 15 %, 17 % e 7,0 % do seu valor médio para o 1º, 2º e 3º níveis, respetivamente.

> **Cádmio**

Na tabela 3.14. é possível verificar os resultados obtidos relativos à média do limite de repetibilidade, do limite de repetibilidade relativo e dos coeficientes de variação relativos, para cada nível de trabalho referente a cádmio. A repetibilidade do método para os três níveis de trabalho foi satisfatória uma vez que o CV_r foi inferior a 10% em cada uma.

Através dos resultados obtidos, definiu-se que em condições de repetibilidade podem ser aceites se a diferença entre eles não exceder os 0,010 mg/kg, 0,040 mg/kg e 0,12 mg/kg para o 1º, 2º e 3º níveis, respetivamente. No entanto, aceitam-se duplicados se a diferença entre eles não for superior a 11 %, 6,0 % e 8,0 % do seu valor médio para o 1º, 2º e 3º níveis, respetivamente.

> **Mercúrio**

A repetibilidade do método para os três níveis de trabalho é satisfatória uma vez que o CV_r é inferior a 10% em cada um (9,0%, 5,5% e 6,0%, respetivamente).

Valores obtidos em duplicado, em condições de repetibilidade podem ser aceites se a diferença entre eles não exceder os 0,0040 mg/kg, 0,030 mg/kg e 0,15 mg/kg para o 1º,

2º e 3º níveis, respetivamente. Uma vez que o intervalo de trabalho é extenso e o valor absoluto pode induzir em erro a eliminação de duplicados considerou-se o CV_{r_i} , ou seja, são aceites as réplicas se a diferença entre estas não for superior a 24 %, 15% e 17% do seu valor médio para o 1º, 2º e 3º níveis, respetivamente.

3.4.2. Precisão intermédia

A precisão do método também pode ser expressa em condições de precisão intermédia, isto é, obtida em análises realizadas nas mesmas condições experimentais, nomeadamente, com o mesmo analista e equipamento, contudo em dias diferentes. A precisão intermédia foi avaliada para os níveis de trabalho usados para o estudo de repetibilidade. É importante salientar que, em cada dia que uma matriz foi analisada, os ensaios foram realizados em duplicado.

> Chumbo

A partir dos resultados obtidos para as amostras analisadas em duplicado determinou-se o valor médio para cada um dos duplicados, bem como o quadrado da diferença entre eles. Deste modo, foi possível determinar o valor do desvio padrão da precisão intermédia, S_i , e recorrendo ao valor médio das médias dos duplicados e ao S_i , determinou-se o valor do coeficiente de variação médio, CV_{PI} . A partir deste calculou-se o valor do limite de precisão intermédia, $CV_{r_{PI}}$, como demonstrado no Anexo F. Na tabela 3.15. encontram-se sumarizados os valores do S_i , do CV_{PI} e do $CV_{r_{PI}}$ obtidos para os três níveis de trabalho considerados.

Tabela 3.15 - Valores do desvio padrão da precisão intermédia, S_i (mg/kg), do coeficiente de variação de precisão intermédia, CV_{PI} (%), e do limite de precisão intermédia relativo, $CV_{r_{PI}}$ (%), obtidos para cada nível de trabalho considerado no estudo da precisão em condições de precisão intermédia

Nível de trabalho (mg/kg)	S_i (mg/kg)	CV_{PI} (%)	$CV_{r_{PI}}$ (%)
[chumbo] < 0,1	0,0020	3,9	11
0,1 ≤ [chumbo] ≤ 0,4	0,0060	3,5	9,7
[chumbo] > 0,4	0,033	2,3	6,4

Consideraram-se para o estudo da precisão intermédia no nível de trabalho baixo, inferior a 0,10 mg/kg, os resultados obtidos para os duplicados de 20 amostras, presentes na tabela E.1. Deste modo, foi possível determinar o valor do S_i , de acordo com a equação 1.11., sendo este igual a 0,0020 mg/kg. Recorrendo ao valor médio das médias dos

duplicados, que equivale a 0,063 mg/kg, e ao S_i determinou-se o valor do CV_{PI} , de acordo com a equação 1.12., sendo este igual a 3,9 %, ou seja, a precisão intermédia é considerada satisfatória uma vez que este valor é inferior a 10 %. A partir deste, calculou-se o valor do CV_{rPI} , como indicado na equação 1.13., que equivaleu a 11 %, ou seja, os valores obtidos em condições de precisão intermédia para a mesma amostra podem ser aceites se a diferença entre eles não exceder os 11 % do seu valor médio.

Para o nível de trabalho intermédio, compreendida entre 0,10 e 0,40 mg/kg, consideraram-se para o estudo da precisão intermédia 23 amostras em duplicado. Tal como referido para o nível de trabalho baixo, determinou-se o valor médio dos valores da concentração de chumbo nestas amostras, juntamente, com o quadrado da diferença entre duplicados. De seguida, determinou-se o valor do S_i , sendo este igual a 0,0060 mg/kg. A partir deste valor, bem como do valor médio das médias dos duplicados, que correspondeu a 0,19 mg/kg, determinou-se o CV_{PI} , sendo este igual a 3,5 %. Por fim, calculou-se o valor do CV_{rPI} , que equivaleu a 9,7 %. Uma vez mais, de acordo com o critério definido pelo laboratório, referido anteriormente, a precisão intermédia é considerada satisfatória e os valores obtidos em condições de precisão intermédia para a mesma amostra neste nível de trabalho podem ser aceites se a diferença entre eles não exceder os 9,7 % do seu valor médio.

Por último, para o nível de trabalho alto, [Chumbo] > 0,40 mg/kg, foram consideradas para o estudo da precisão intermédia neste intervalo 19 amostras em duplicado. A partir destes valores, determinou-se o valor médio da concentração de chumbo nestas amostras, bem como, o quadrado da diferença entre duplicados. De seguida, determinou-se o valor do S_i , sendo este igual a 0,033 mg/kg. A partir deste valor, bem como do valor médio das médias dos duplicados, que equivale a 1,5 mg/kg, determinou-se o CV_{PI} , sendo este igual a 2,3 %. Por fim, calculou-se o valor do CV_{rPI} , que equivale a 6,4 %. Assim, de acordo com o estipulado pelo laboratório, a precisão intermédia é considerada satisfatória uma vez que o CV_{PI} foi inferior a 10 %. Constatou-se ainda que valores obtidos em condições de precisão intermédia para a mesma amostra neste nível de trabalho podem ser aceites se a diferença entre eles não exceder os 6,4 % do seu valor médio.

› **Arsénio, cádmio, mercúrio**

Para os restantes metais realizou-se o tratamento de resultados das condições de precisão intermédia de forma idêntica ao apresentado para o chumbo. Posto isto, os resultados relativos aos mesmos encontram-se descritos na tabela 3.16.

Tabela 3.16 - Análise da precisão intermédia através dos valores do desvio padrão da precisão intermédia, S_i (mg/kg), do coeficiente de variação médio, CV_{PI} (%) e do limite de precisão intermédia, CV_{rPI} (%)

Metal	Nível (mg/kg)	S_i (mg/kg)	CV_{PI} (%)	CV_{rPI} (%)
Arsénio	< 0,100	0,0020	4,3	12
	0,100 – 0,59	0,0050	2,1	5,9
	≥ 0,60	0,035	1,9	5,4
Cádmio	< 0,100	0,0020	3,7	10
	0,100 – 0,599	0,0040	2,2	6,0
	≥ 0,60	0,025	1,6	4,6
Mercúrio	< 0,100	0,0010	4,6	13
	0,100 – 0,299	0,0070	4,3	12
	≥ 0,300	0,055	4,3	12

A partir dos resultados apresentados na tabela 3.16., foi possível constatar que, geralmente, à medida que o nível de concentração aumenta, o CV_{PI} e o CV_{rPI} diminuíram, enquanto o S_i aumenta. Verificou-se que no mercúrio isto não acontece, uma vez que no nível mais alto os valores são ligeiramente superiores aos do nível intermédio. Isto pode ter acontecido devido a erros experimentais aquando da realização do ensaio.

A precisão intermédia é considerada satisfatória se o CV_{PI} for inferior a 10 %. Uma vez que para os metais analisados, em todos os níveis, o coeficiente de variação médio é inferior a 10 %, pode-se considerar a precisão intermédia é satisfatória, ou seja, os erros aleatórios observados em análises efetuadas em condições de precisão intermédia não afetaram a confiança nos resultados produzidos. Também é de notar ainda que valores obtidos em condições de precisão intermédia para a mesma amostra podem ser aceites se a diferença entre eles não exceder o valor obtido de CV_{rPI} do seu valor médio.

3.5. Justeza

A justeza foi avaliada com base nos resultados obtidos das matrizes analisadas, nos resultados dos ensaios de comparação interlaboratorial e nos ensaios de recuperação.

3.5.1. Ensaios de comparação interlaboratorial

> Chumbo

Para avaliar a justeza dos resultados do método em estudo, teve-se em conta os resultados obtidos da concentração de chumbo, em $\mu\text{g}/\text{kg}$, para amostras provenientes da participação em ensaios interlaboratoriais. Os resultados em questão, na forma de valor médio, encontram-se apresentados na tabela 3.17. juntamente com os valores de concentração de chumbo de referência para cada amostra, a partir dos quais foi possível determinar o *z-score*, como se encontra explícito no Anexo G. Uma vez que se trata de ensaios que englobam vários laboratórios, o desvio padrão apresentado tem em conta todos os ensaios realizados pelos laboratórios que entraram neste estudo estatístico.

*Tabela 3.17 – Avaliação da justeza: valores médios obtidos pelo laboratório, $[\text{Pb}]_{\text{lab}}$, para a concentração de chumbo em amostras analisadas em ensaios interlaboratoriais, juntamente com o valor de referência da concentração de chumbo nessas amostras, $[\text{Pb}]_{\text{ref}}$, ambas em $\mu\text{g}/\text{kg}$, o respetivo desvio padrão (*s*) e *z-score*. O valor *n* corresponde ao número de laboratórios que participaram no ensaio interlaboratorial.*

Matriz	$[\text{Pb}]_{\text{lab}}$ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	$[\text{Pb}]_{\text{ref}}$ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	n	s	<i>z-score</i>
Vinagre de vinho branco	5,00	5,00	11	6,0	0,00
Pasta de tomate	313	447	46	81	-1,66
Caranguejo enlatado	69,0	62,1	64	14	0,500

A partir da análise da tabela 3.17. verificou-se que o valor mínimo de *z-score*, em módulo, foi 0,500 e o valor máximo calculado foi 1,66. Considerando que o desempenho do laboratório é satisfatório quando o valor de $|\text{z-score}|$ for inferior a 2, foi possível concluir que o laboratório produziu resultados fidedignos. Como tal, o método a ser avaliado é considerado justo, o que indica que não existem evidências da ocorrência de erros sistemáticos.

> Arsénio, cádmio e mercúrio

No estudo da justeza para o arsénio, o cádmio e o mercúrio (tabelas 3.18., 3.19. e 3.20., respetivamente) verificou-se que os valores do módulo de *z-score* obtidos para os três

metais estavam compreendidos entre 0,500 e 1,35. Tendo sido inferiores a 2 em todos os casos, o desempenho do laboratório foi satisfatório no que toca à análise dos restantes metais em estudo.

Tabela 3.18 - Avaliação da justeza: valores médios obtidos pelo laboratório, $[\overline{As}]_{lab}$, para a concentração de arsénio em amostras analisadas em ensaios interlaboratoriais, juntamente com o valor de referência da concentração de arsénio nessas amostras, $[As]_{ref}$, ambas em $\mu\text{g}/\text{kg}$, o respetivo desvio padrão (s) e z -score. O valor n corresponde ao número de laboratórios que participaram no ensaio interlaboratorial.

Matriz	$[\overline{As}]_{lab}$ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	$[As]_{ref}$ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	n	s	z-score
Carne de caranguejo enlatada	12,3	14,4	59	1,6	-1,35
Sumo de fruta	70,0	65,0	12	9,0	0,560

Tabela 3.19 - Avaliação da justeza: valores médios obtidos pelo laboratório, $[\overline{Cd}]_{lab}$, para a concentração de cádmio em amostras analisadas em ensaios interlaboratoriais, juntamente com o valor de referência da concentração de cádmio nessas amostras, $[Cd]_{ref}$, ambas em $\mu\text{g}/\text{kg}$, o respetivo desvio padrão (s) e z -score. O valor n corresponde ao número de laboratórios que participaram no ensaio interlaboratorial.

Matriz	$[\overline{Cd}]_{lab}$ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	$[Cd]_{ref}$ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	n	s	z-score
Pasta de tomate	240	266	46	52	-0,50
Carne de caranguejo enlatada	7,20	7,99	70	0,94	-0,84
Sumo de fruta	40,0	38,0	14	4,0	0,50

Tabela 3.20- Avaliação da justeza: valores médios obtidos pelo laboratório, $[\overline{Hg}]_{lab}$, para a concentração de mercúrio em amostras analisadas em ensaios interlaboratoriais, juntamente com o valor de referência da concentração de mercúrio nessas amostras, $[Hg]_{ref}$, ambas em $\mu\text{g}/\text{kg}$, o respetivo desvio padrão (s) e z -score. O valor n corresponde ao número de laboratórios que participaram no ensaio interlaboratorial.

Matriz	$[\overline{Hg}]_{lab}$	$[Hg]_{ref}$	n	s	z-score
Carne de caranguejo enlatada	110	112	61	25	-0,080
Sumo de fruta	250	239	10	20	0,55

3.5.2. Ensaio de recuperação

A justeza do método também foi avaliada através dos resultados obtidos na realização de ensaios de recuperação. Os resultados obtidos estão representados na tabela 3.21. Na tabela H.1. é possível verificar a concentração utilizada, em mg/L , em cada contaminação para o Pb.

Tabela 3.21 – Valores da taxa de recuperação, em percentagem, dos metais em estudo para as diferentes matrizes e respetiva média.

Grupo	Matriz	Recuperação (%)			
		Arsénio	Cádmio	Mercúrio	Chumbo
Alimentos para animais	Alimento para gato	96,9	104	81,7	86,6
	Ração	87,6	90,6	83,6	90,1
Cereais, leguminosas, pseudocereais e derivados	Maizena 1	89,7	96,3	92,1	94,1
	Maizena 2	87,9	109	80,9	92,4
	Maizena 3	94,7	104	112	96,2
	Maizena 4	96,5	-	90,9	95,1
Média		92,2	101	90,3	92,4
Valor máximo		96,9	109	112	96,2
Valor mínimo		87,6	90,6	80,9	86,6

Como os valores obtidos se encontravam no intervalo de recuperação admitido ([80 – 120] %), o método foi considerado justo.

3.6. Seletividade/Especificidade

A seletividade/especificidade foi avaliada analisando os seguintes resultados:

- Ensaios de recuperação (fortificação da amostra).
- Recuperação aparente (valor calculado através da razão entre a concentração obtida e a concentração do analito atribuída ao material de referência certificado).

Estes ensaios permitiram avaliar a presença/ausência de interferências que possam, ou não, interferir com o resultado final. Os ensaios de recuperação efetuados encontram-se na tabela H.1. do Anexo H, estando apenas como exemplo os ensaios relativos ao Pb. Os valores das taxas de recuperação encontram-se na tabela 3.21. e os valores finais relativos à recuperação aparente encontram-se na tabela 3.22.

Tabela 3.22 – Taxa de recuperação aparente, em %, respetiva a cada metal.

Metal/mineral	% recuperação média aparente
Arsénio	94,1
Cádmio	91,5
Mercúrio	105
Chumbo	94,2

Com base nos ensaios realizados e nos resultados obtidos, demonstrou-se que o método é específico/seletivo uma vez que as taxas de recuperação se encontram entre 80% e 120%, ou seja, não existem compostos interferentes com os analitos.

3.7. Estimativa da incerteza do método

De modo que todos os resultados obtidos pelo método analítico possam ter a mesma incerteza relativa associada, esta foi estimada recorrendo a dados de validação e de controlo de qualidade. Assim, pretendeu-se estimar a incerteza do método combinando os dados obtidos no estudo da precisão e da justeza, como demonstrado no Anexo I. Contudo, é de destacar que este parâmetro de desempenho foi calculado separadamente para cada um dos níveis de trabalho consideradas.

> Chumbo

Para o nível de trabalho alto, [Chumbo] > 0,40 mg/Kg, determinou-se a componente da incerteza associada à precisão do método, considerando os dados do estudo da precisão intermédia, uma vez que mimetizam as condições de rotina no laboratório. Assim, para este nível, considerou-se o CV_{PI} de 2,3 %, sendo então a $u_{(precisão)relativa}$ igual a 2,3 %.

Para o cálculo da componente da incerteza associada à justeza do método ($u_{(justeza)relativa}$), considerou-se o resultado obtido na realização de um ensaio de recuperação. Na realização do ensaio de recuperação, verificou-se que a $[\overline{Pb}]_{obs}$ foi de 1,39 mg/kg. Para além disso, sabe-se que a $[Pb]_{teo}$ correspondeu a 1,51 mg/kg. A partir destes dois valores, determinou-se o *bias* relativo, sendo este igual a 8,34 %. A fortificação da amostra foi efetuada através da adição de uma solução padrão com concentração de 0,0750 mg (Pb)/kg e, determinou-se a $u_{(add)relativa}$, sendo esta igual a 1,1 %. Foi considerada a $u_{(Vol)relativa}$, sendo esta igual a 0,10 %. De seguida, calculou-se a $u_{(recuperação,c)relativo}$, sendo que este correspondeu a 1,1 %. Por fim, calculou-se a $u_{(justeza)relativa}$ sendo esta igual a 8,4 %.

Deste modo, calculou-se a $u_c(y)$, que correspondeu a 8,7 %. Como tal, a U deste nível de trabalho foi de 17 %.

› **Arsénio, cádmio, mercúrio e chumbo**

Para os restantes níveis de trabalho do chumbo e restantes metais em estudo, procedeu-se à estimativa da incerteza de forma análoga ao referido para [Chumbo] > 0,40 mg/kg. Deste modo, um resumo dos resultados obtidos para cada um encontram-se expressos na tabela 3.23.

Tabela 3.23 – Incerteza associada a cada metal e respetivos níveis de trabalho, em %.

Metal/ mineral	Nível (mg/kg)	Incerteza relativa (%)
Arsénio	< 0,100	15
	0,100 – 0,59	24
	≥ 0,60	24
Cádmio	< 0,100	17
	0,100 – 0,599	16
	≥ 0,60	15
Mercúrio	< 0,100	23
	0,100 – 0,299	24
	≥ 0,300	19
Chumbo	< 0,100	16
	0,10 – 0,399	16
	≥ 0,40	17

É de realçar que a componente associada à justeza foi aquela que apresentou maior contribuição para a estimativa da incerteza de cada metal, uma vez que foi considerado o valor do CV_{PI} para a incerteza associada à precisão e o maior valor obtido para este parâmetro, entre todos, foi de 4,6 % para o elemento Hg.

4. Conclusões

O objetivo deste trabalho foi a validação interna do método já implementado noutro laboratório do grupo para quantificar o teor de chumbo, cádmio, arsénio e mercúrio por ICP-MS em géneros alimentícios. Para tal, realizou-se um conjunto de procedimentos que levou à determinação dos parâmetros de desempenho do método, nomeadamente a linearidade, a sensibilidade, o limite de quantificação, a gama de trabalho, a repetibilidade, a precisão intermédia, a justeza, a seletividade e, a incerteza do método.

Neste trabalho mostrou-se que o método analítico apresentava uma correlação linear entre a resposta obtida por ICP-MS e a concentração de analito dado o elevado valor do coeficiente de correlação obtido, sendo que a média dos valores obtidos para arsénio, cádmio e chumbo foi de 1,000 e para o mercúrio foi de 0,9991. Verificou-se que a sensibilidade do método se manteve inalterada ao longo do tempo, dado que não ocorreram variações significativas nos declives das curvas de calibração traçadas em diferentes dias.

Foi possível validar experimentalmente o limite de quantificação, com adição de analito de concentração idêntica à do primeiro padrão da curva de calibração, tendo-se obtido taxas de recuperação associadas aos ensaios em questão entre 96 % e 112 %, estando estes valores dentro do limite aceitável. A gama de trabalho foi definida tendo em conta o limite de quantificação e a concentração mais alta obtida em amostras para cada metal.

Quanto à precisão do método, tanto o estudo da repetibilidade, como o estudo da precisão intermédia mostraram que nos níveis de trabalho estudados os valores dos CV foram aceitáveis e, portanto, os erros aleatórios observados não afetavam a confiança nos resultados produzidos. Obtiveram-se coeficientes de variação de repetibilidade entre 2,0 % e 9,0 % e coeficientes de variação de precisão intermédia entre 1,6 % e 4,6 %.

Constatou-se, ainda, que não foram evidenciadas ocorrência de erros sistemáticos uma vez que o método mostrou ser justo, quer por participação em ensaios interlaboratoriais, quer na realização de ensaios de recuperação, tendo se obtido valores de módulo de z-score inferiores a 2 e taxas de recuperação entre 80,9% e 112%.

Por todos estes motivos, é possível afirmar que o método foi devidamente validado para a quantificação de Pb, Cd, As e Hg nas matrizes alimentares estudadas.

Bibliografia

1. ISO 9000:2015 – Sistemas de Gestão de Qualidade.
2. Zima, T. *Accreditation of Medical Laboratories-System, Process, Benefits for Labs*. J. Med. Biochem. 2017, 36, 231–237.
3. "Mérieux NutriSciences Portugal ", Merieuxnutrisciences.com, 2021. [online]. Disponível em: <https://www.merieuxnutrisciences.com/pt/>. [Acedido: 10/3/2021].
4. *European Food Safety Authority*. 2021. *Metals as contaminants in food*. [online] Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/metals-contaminants-food>> [Acedido: 14/03/2021].
5. Económica, A., 2021. Perigos de Origem Alimentar. [online] Asae.gov.pt. Disponível em: <<https://www.asae.gov.pt/cientifico-laboratorial/area-tecnico-cientifica/perigos-de-origem-alimentar.aspx>> [Acedido: 13/3/2021].
6. *European Food Safety Authority*, "Scientific Opinion on Lead in Food," EFSA Journal, vol. 8, no. 4, p. 1570, 2010
7. *Food Safety Authority of Ireland - Mercury, Lead, Cadmium, Tin and Arsenic in Food, May 2009* - ficheiro PDF descarregado a 14/3/2021
8. Conselho da União Europeia, "Regulamento (UE) N. o 1881/2006 da Comissão", J. Of. da União Eur., vol. 2015, 2006.
9. *European Food Safety Authority*, "Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on cadmium in food.," EFSA Journal., no. 980, pp. 1–139, 2009
10. Conselho da União Europeia, "Regulamento (UE) N.o 488/2014 da Comissão", J. Of. da União Eur., vol. 2014, no. 2, pp. 10–14, 2014
11. *European Food Safety Authority*, "Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of mercury and methylmercury in food" EFSA Journal, vol. 10, no. 12, p. 2985, 2012.
12. *European Food Safety Authority*, "Scientific Opinion on Arsenic in Food," EFSA Journal, vol. 7, no. 10, p. 1351, 2010.
13. Conselho da União Europeia, "Regulamento (UE) 2016/582 da Comissão," J. Of. da União Eur., pp. 48–53, 2016.

14. Conselho da União Europeia, “Regulamento (UE) 2015/1006 da Comissão,” J. Of. da União Eur., no. 6, pp. 14-16, 2015.
15. Perkin Elmer SCIEX, “*The 30-minutes Guide to ICP-MS*”, *ICP- Mass Spectrometry: Technical Note*, 1-7, 2004.
16. Agilent Technologies, “*Agilent 7800/7900 ICP-MS: Hardware Maintenance Manual*”
17. Thomas, R., “*A Beginner’s Guide to ICP-MS- Part III: The Plasma Source*”, *Spectroscopy*, 16, 26-30, Junho 2001.
18. Thomas, R., “*A Beginner’s Guide to ICP-MS- Part IV: The Interface Region*”, *Spectroscopy*, 16, 26-28, Julho 2001.
19. Thomas, R., “*A Beginner’s Guide to ICP-MS- Part V: The Ion Focusing System*”, *Spectroscopy*, 16, 38-44, Setembro 2001.
20. Thomas, R., “*A Beginner’s Guide to ICP-MS- Part VI: The Mass Analyzer*”, *Spectroscopy*, 16, 44-48, Outubro 2001.
21. Thomas, R., “*A Beginner’s Guide to ICP-MS- Part X: Detectors*”, *Spectroscopy*, 17, 34-39, Abril 2002.
22. Thomas, R., “*A Beginner’s Guide to ICP-MS- Part XII: A Review of Interferences*”, *Spectroscopy*, 17, 24-31, Outubro 2002.
23. “*Method 6020A: Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry*,” no. Cd, pp.1–23, 1998.
24. ISO 17294, “*Water quality- Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) - Part 1: General guidelines*”; 2004.
25. Dean, J. R.; “*Practical Inductively Coupled Plasma Spectroscopy*”-Wiley-ANTSA *Analytical Techniques in the Sciences*, pp. 89- 147, UK, 2005.
26. NP EN ISO/IEC 17025:2005, “Requisitos Gerais de Competência para Laboratórios de Ensaio e Calibração”; Instituto Português da Qualidade, segunda edição, 2005.
27. Relacre. Guia Relacre 13 Validação de Métodos Internos de Ensaio Em Análise Química. Relacre. 2000, p 50.
28. Eurachem. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods*; 1998
29. Relacre. Guia Relacre 3 Validação de Resultados Em Laboratórios Químicos. Guia Relacre. 1996, pp 1–47.
30. Ribani, M., et al., Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, 2004. 27: p. 771-780.

31. Sargaço, B., #Otimização e validação de um método de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) para a determinação do edulcorante ciclamato. Ocorrência em adoçantes de mesa., 2013, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa.
32. Relacre, A.d.L.A.d.P., Guia Relacre 7- Ensaios Interlaboratoriais em Química. 1996: Lisboa.
33. USP, *Validation of Compendial Methods. United States Pharmacopoeia*, 2006.
34. Mukaka, M. M. “*Statistics Corner: A Guide to Appropriate Use of Correlation Coefficient in Medical Research*”. *Malawi Med. J.* 2012, 24, 69–71.
35. Miller, J.M.a.J., *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. 2005: *Pearson Education Limited*.
36. Chui, Q.S.H., J.M.d.A. Bispo, and C.O. Iamashita, O papel dos programas interlaboratoriais para a qualidade dos resultados analíticos. *Química Nova*, 2004. 27: p. 993-1003.
37. Oliveira, E.C.d., Comparação das diferentes técnicas para a exclusão de “outliers”. Rede Metrológica do Estado de São Paulo - REMESP, 2008.
38. Piet van Zoonen, R.H., Steven M. Gort, Henk J. van de Wiel, Henk A. van 't Klooster, *Some practical examples of method validation in the analytical laboratory. trends in analytical chemistry*, 1999. 18.
39. SillikerSA, PCQ.34 – Procedimento de Controlo da Qualidade.34, Validação de métodos em análise química. 2014.
40. Alexopoulos EC. Introduction to Multivariate Regression Analysis. *Hippokratia* 2010, 14, 23–28.
41. DOQ-CGCRE-008, Orientação sobre validação de métodos de ensaio. 2007: Inmetro.
42. Figueiredo, T.M.P., “Validação de Métodos Analíticos: Determinação do teor de açúcar numa amostra de produto alimentar”, 2012, Universidade de Coimbra: Departamento de Química.
43. Relacre. Guia Relacre 31 Quantificação Da Incerteza de Medição Em Ensaios Químicos e Físico-Químicos. 2018, pp 1–58. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
44. Silliker S.A., PAFQ.015 – Procedimento relativo às análises físico-químicas 015, Determinação de minerais e metais por ICP.

Anexos

A. Teores máximos admissíveis em alimentos

Nas tabelas A.1., A.2., A.3. e A.4. encontram-se os valores dos teores máximos admissíveis em alimentos pela União Europeia de chumbo, cádmio, mercúrio e arsénio, respetivamente.

Tabela A.1 - Teores máximos de chumbo em alimentos fixados pela União Europeia, segundo o regulamento N° 1881/2006 da Comissão Europeia, de 19 de dezembro de 2006 [8]

Géneros Alimentícios	Teores máximos de chumbo (mg/kg)
Leite cru, leite tratado termicamente e leite para o fabrico de produtos lácteos	0,020
Fórmulas para lactentes e fórmulas de transição	0,020
Carne (com exceção de miudezas) de bovino, ovino, suíno e aves de capoeira	0,10
Miudezas de bovino, ovino, suíno e aves de capoeira	0,50
Parte comestível do peixe	0,30
Crustáceos, excluindo a carne escura de caranguejo e excluindo a carne de cabeça e do tórax da lagosta e de grandes crustáceos similares (<i>Nephropidae</i> e <i>Palinuridae</i>)	0,50
Moluscos bivalves	1,5
Cefalópodes (sem vísceras)	1,0
Cereais, legumes e leguminosas	0,20
Produtos hortícolas, com exceção de brássicas, produtos hortícolas de folha, plantas aromáticas frescas e cogumelos. No caso das batatas, o teor máximo aplica-se a batatas descascadas	0,10
Brássicas, produtos hortícolas de folha e cogumelos de cultura	0,30
Frutos, com exceção de bagas e frutos pequenos	0,10
Bagas e frutos pequenos	0,20
Óleos e gorduras, incluindo a matéria gorda do leite	0,10
Sumos de frutos, sumos de frutos concentrados reconstituídos e néctares de frutos	0,050
Vinho (incluindo vinho espumante, com exceção do vinho licoroso), sidra, perada e vinho de frutos	0,20
Vinho aromatizado, bebidas aromatizadas à base de vinho e cocktails aromatizados de produtos vitivinícolas	0,20

Tabela A.2 - Teores máximos de cádmio em alimentos, fixados pela União Europeia, segundo o regulamento N° 488/2014 da Comissão Europeia de 12 de maio de 2014 [10]

Géneros Alimentícios	Teores máximos de cádmio (mg/kg)
Produtos hortícolas e frutos	0,050
Raízes e tubérculos (exceto aipo-rábano, pastinagas, salsifis e rábanos), produtos hortícolas de caule (com exceção de aipos).	0,10
Produtos hortícolas de folha, plantas aromáticas frescas, couves de folha, aipos, aipo-rábano, pastinagas, salsifis e os seguintes cogumelos: <i>Agaricus bisporus</i> (cogumelo comum), <i>Pleurotus ostreatus</i> (pleuroto) e <i>Lentinula edodes</i> (“shiitake”)	0,20
Cogumelos, com exceção dos referidos anteriormente	1,0
Grãos de cereais, com exceção de trigo e arroz	0,10
Grãos de trigo, grãos de arroz e grãos de soja	0,20
Carne (com exceção de miudezas) de bovino, ovino, suíno e aves de capoeira	0,050
Carne de cavalo, com exceção de miudezas	0,20
Fígado de bovino, ovino, suíno, aves de capoeira e cavalo	0,50
Rim de bovino, ovino, suíno, aves de capoeira e cavalo	1,0
Parte comestível do peixe, com exceção das espécies referidas em outros pontos	0,050
Parte comestível dos seguintes peixes: carapau (espécie <i>Scomber</i>), atum (espécies <i>Thunnus</i> , <i>Katsuwonus pelamis</i> , <i>Euthynnus</i>) e <i>Sicyopterus lagocephalus</i>	0,10
Parte comestível dos seguintes peixes: judeu (espécie <i>Auxis</i>)	0,15
Parte comestível dos seguintes peixes: biqueirão (espécie <i>Engraulis</i>) espadarte (<i>Xiphias gladius</i>) sardinha (<i>Sardina pilchardus</i>)	0,25
Crustáceos: músculo dos apêndices e do abdómen. No caso dos caranguejos e crustáceos similares (<i>Brachyura</i> e <i>Anomura</i>), a parte comestível dos apêndices	0,50
Moluscos bivalves	1,0
Cefalópodes (sem vísceras)	1,0
Fórmulas em pó ou líquidas feitas a partir de lácteos	0,0010-0,010
Alimentos à base de cereais transformados e alimentos para bebés	0,040
Suplementos alimentares	1,0
Suplementos alimentares que consistam exclusiva ou principalmente em algas secas, produtos derivados de algas ou moluscos bivalves secos	3,0

Tabela A.3 - Teores máximos de mercúrio em alimentos fixados pela União Europeia, segundo o regulamento N° 1881/2006 da Comissão Europeia, de 19 de dezembro de 2006. [8]

Géneros Alimentícios	Teores máximos de mercúrio (mg/kg)
Produtos da pesca e parte comestível do peixe, com exceção das espécies referidas noutros pontos. Os teores máximos aplicam-se aos crustáceos, com exceção da carne escura do caranguejo e da carne da cabeça e do tórax da lagosta e de grandes crustáceos similares (<i>Nephropidae</i> e <i>Palinuridae</i>)	0,50
Parte comestível dos seguintes peixes: tamboril (<i>Lophius species</i>) peixe-lobo riscado (<i>Anarhichas lupus</i>) bonito (<i>Sarda sarda</i>) enguia (<i>Anguilla species</i>) ronquinhas, olho-de-vidro, olho-de-vidro laranja (<i>Hoplostethus species</i>) lagartixa-da-rocha (<i>Coryphaenoides rupestris</i>) alabote-do-atlântico (<i>Hippoglossus hippoglossus</i>) espadins (<i>Makaira species</i>) areeiros (<i>Lepidorhombus species</i>) salmonetes (<i>Mullus species</i>) lúcio (<i>Esox lucius</i>) palmeta (<i>Orcynopsis unicolor</i>) fanecão (<i>Tricopterus minutes</i>) carochão (<i>Centroscymnus coelolepis</i>) raia (<i>Raja species</i>) peixe-vermelho (<i>Sebastes marinus</i> , <i>S. mentella</i> , <i>S. viviparus</i>) veleiro-do-atlântico (<i>Istiophorus platypterus</i>) peixe-espada (<i>Lepidopus caudatus</i> , <i>Aphanopus carbo</i>) bicas e gorazes (<i>Pagellus species</i>) tubarões (todas as espécies) escolares (<i>Lepidocybium flavobrunneum</i> , <i>Ruvettus pretiosus</i> , <i>Gempylus serpens</i>) esturjão (<i>Acipenser species</i>) espadarte (<i>Xiphias gladius</i>) atuns (<i>Thunnus species</i> , <i>Euthynnus species</i> , <i>Katsuwonus pelamis</i>)	1,0

Tabela A.4 - Limites máximos de arsénio, na forma inorgânica, permitidos em arroz e produtos à base de arroz.[14]

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

B. Relatório de *performance* e Relatório de *tune*

Neste anexo encontram-se dois exemplos de um *Performance Report* e de um *Tune Report* usados nas verificações iniciais da utilização do equipamento ICP-MS. Estes encontram-se representados nas figuras B.1. e B.2.

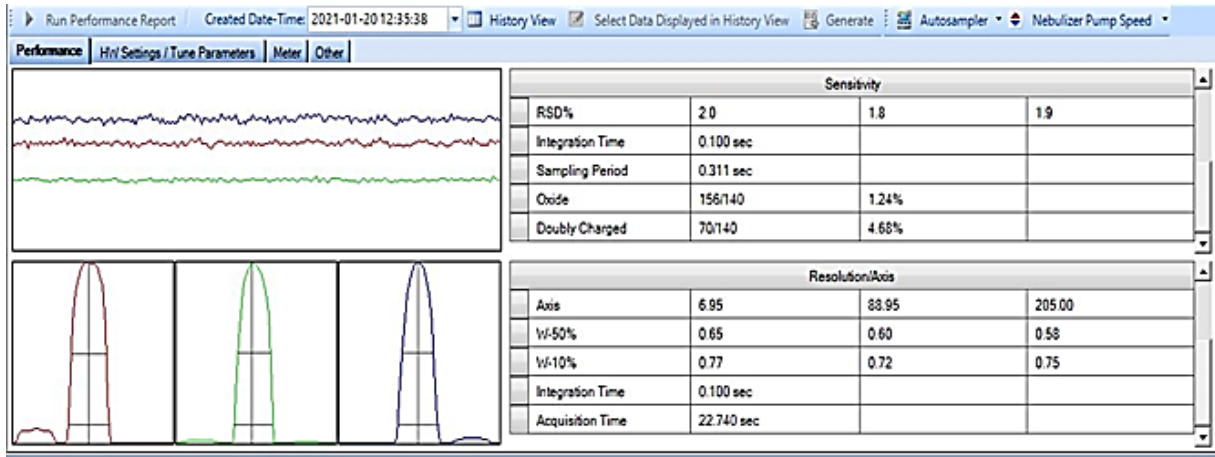


Figura B.1 - Performance Report

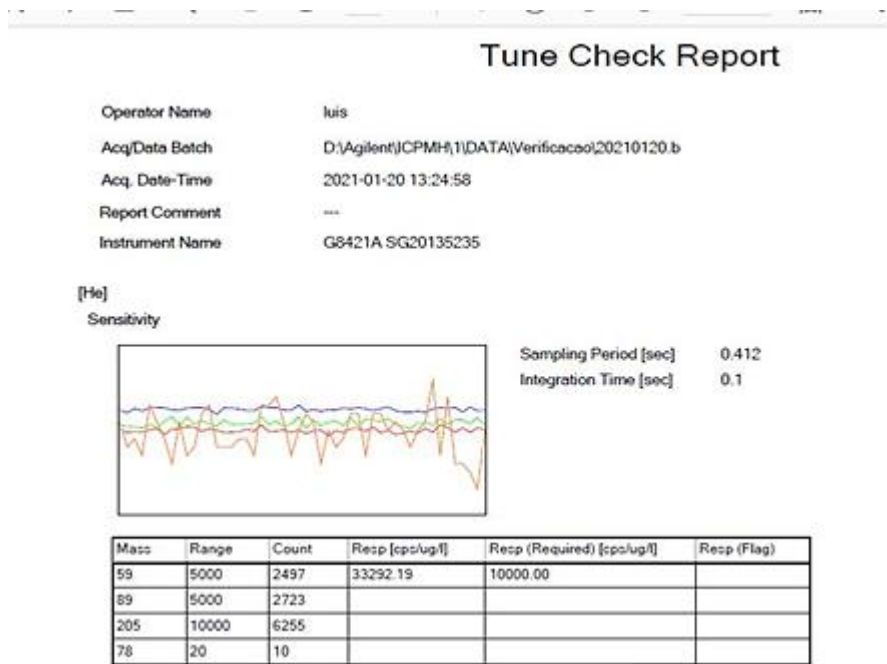


Figura B.2 - Tune Report

C. Linearidade

Neste anexo estão representadas todas as retas de calibração traçadas, bem como a indicação do coeficiente de correlação de cada reta.

› **Arsénio**

Na figura C.1. encontram-se as 5 retas de calibração para a análise de arsénio.

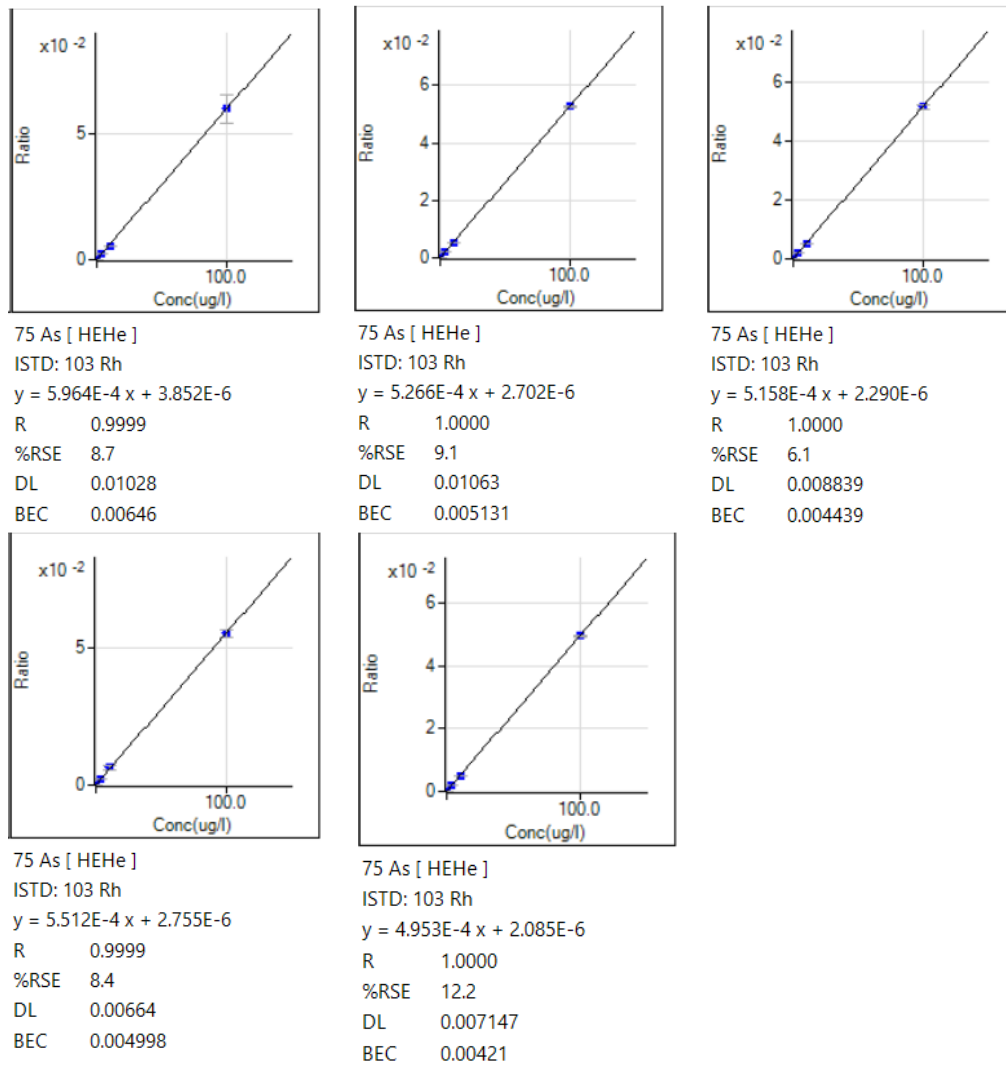


Figura C.1 - Retas de calibração de arsénio

Na tabela C.1. estão indicados os valores do coeficiente de correlação das retas representadas na figura C.1.

Tabela C.1 - Coeficiente de correlação das retas de calibração de arsénio.

Reta	Coeficiente de correlação
1	0,9999
2	1,000
3	1,000
4	1,000
5	0,9999

› **Cádmio**

Na figura C.2. encontram-se as 5 retas de calibração de cádmio.

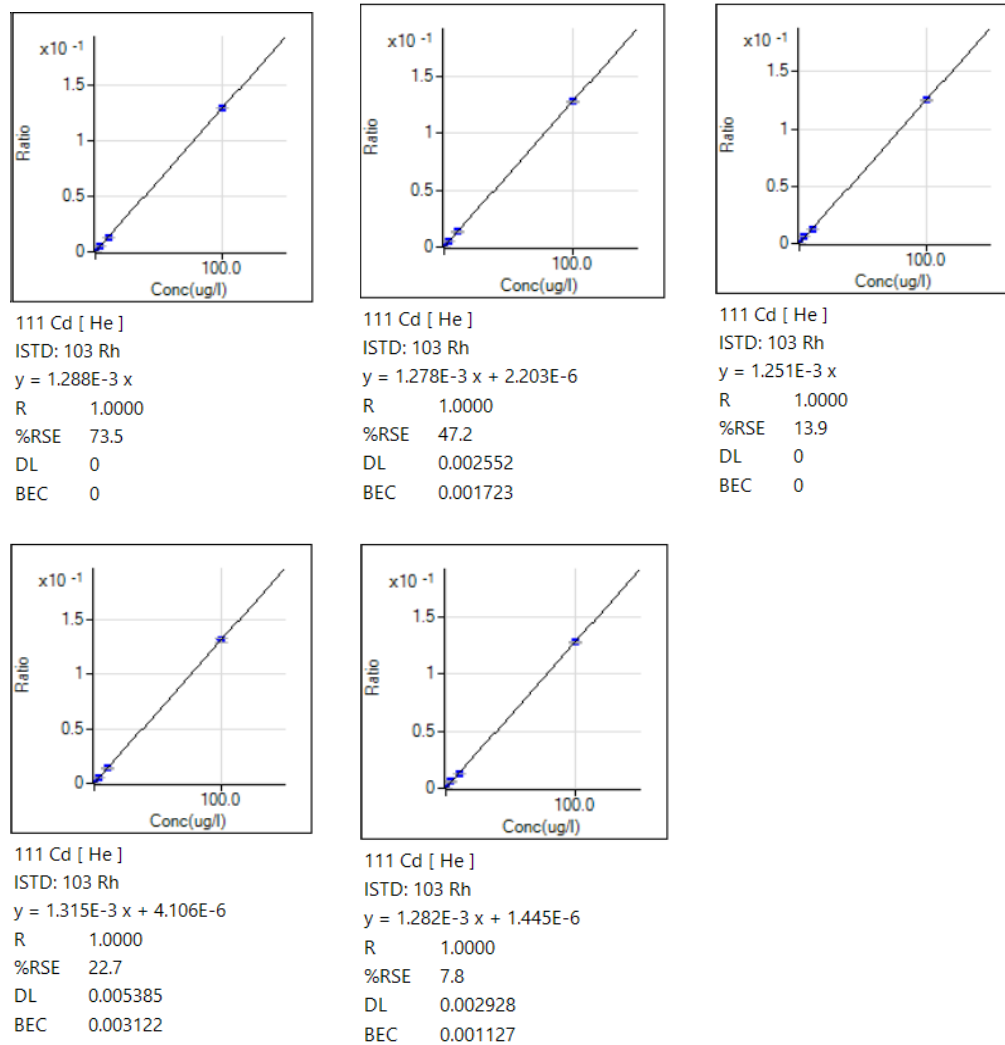


Figura C.2 - Retas de calibração de cádmio

Na tabela C.2. estão indicados os valores do coeficiente de correlação das retas representadas na figura C.2.

Tabela C.2 - Coeficiente de correlação das retas de calibração de cádmio..

Reta	Coeficiente de correlação
1	1,000
2	1,000
3	1,000
4	1,000
5	1,000

› Mercúrio

Na figura C.3. encontram-se as 5 retas de calibração de mercúrio.

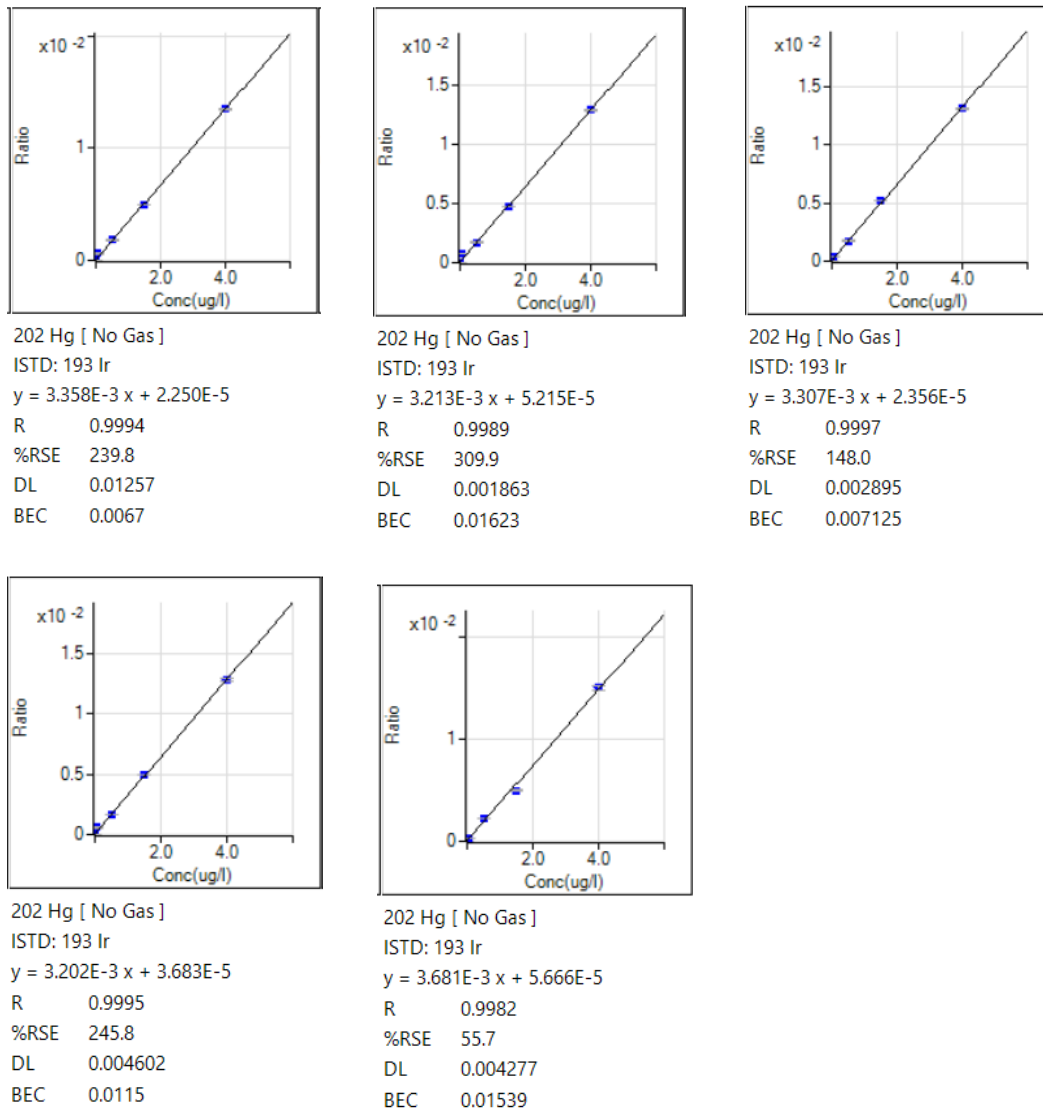


Figura C.3 - Retas de calibração de mercúrio

Na tabela C.3. estão indicados os valores do coeficiente de correlação das retas representadas na figura C.3.

Tabela C.3 - Coeficiente de correlação das retas de calibração de mercúrio.

Reta	Coeficiente de correlação
1	0,9994
2	0,9989
3	0,9997
4	0,9995
5	0,9982

› **Chumbo**

Na figura C.4. encontram-se as 5 retas de calibração de chumbo.

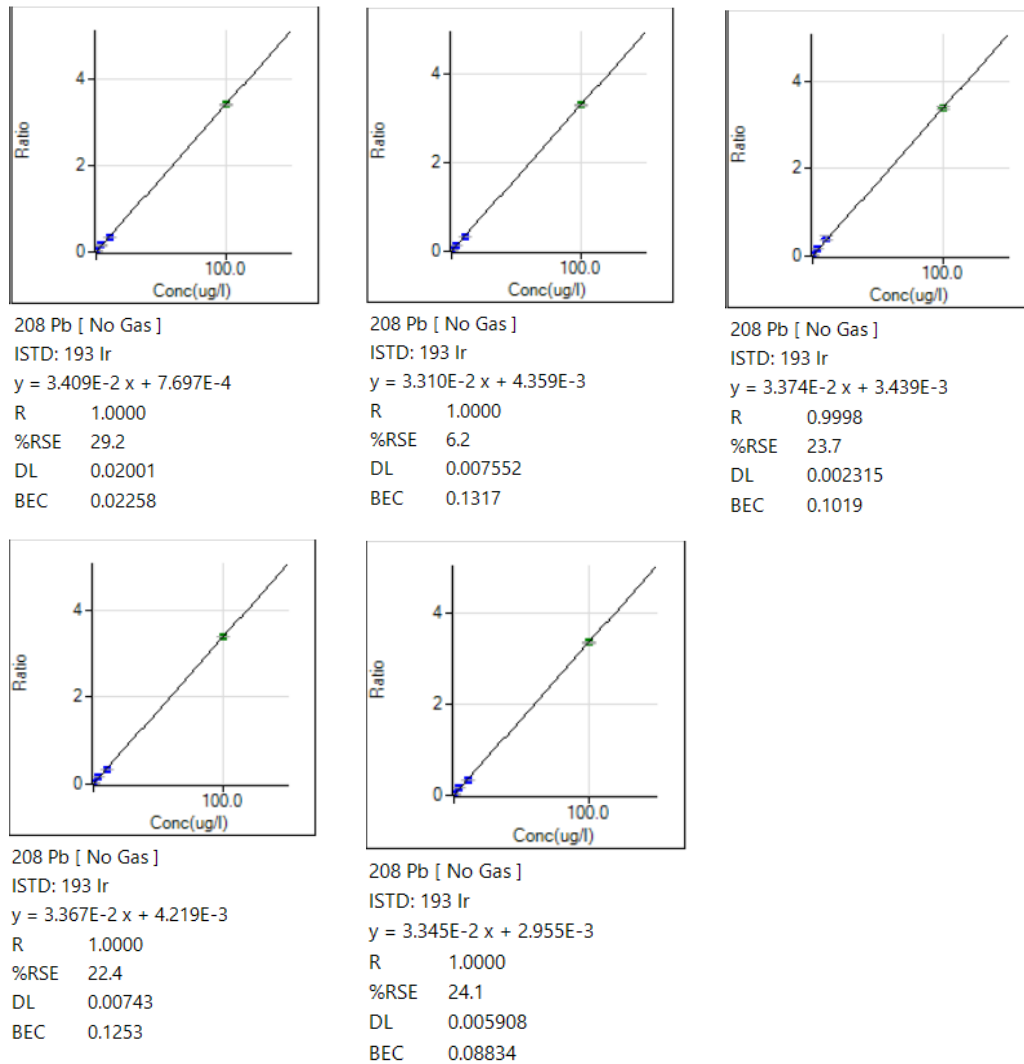


Figura C.4 - Retas de calibração de chumbo

Na tabela C.4. estão indicados os valores do coeficiente de correlação das retas representadas na figura C.4.

Tabela C.4 - Coeficiente de correlação das retas de calibração de chumbo.

Reta	Coeficiente de correlação
1	1,000
2	1,000
3	0,9998
4	1,000
5	1,000

D. Limite de quantificação

Para a validação experimental do LDQ, determinou-se, para a matriz Maizena, a concentração média da amostra sem fortificação e, após fortificação ao nível do LDQ, o resultado médio obtido, o resultado teórico e a taxa de recuperação.

- **Concentração da amostra sem contaminação**

Foram considerados dois ensaios:

$$\overline{[Amostra_{branco}]} = \frac{0,0037 + 0,0030}{2} = 0,0034 \text{ mg/kg}$$

- **Concentração média obtida**

Para fortificar a amostra ao nível do LDQ, à toma de 0,50 g da matriz maizena adicionou-se 0,100 mL de uma solução com concentração de Pb de 0,025 mg/L, tendo sido feita uma fortificação de 0,000003 mg.

$$\overline{[Amostra_{fortificada}]} = \frac{0,0080 + 0,0088 + 0,0073}{3} = 0,0080 \text{ mg/kg}$$

- **Concentração teórica**

Para um ensaio onde se pesou 0,5148g de amostra:

$$Amostra_{teórica} = \frac{0,0000030}{\frac{0,52}{1000}} = 0,0049 \text{ mg/kg}$$

$$\overline{[Amostra_{teórica}]} = \frac{0,0049 + 0,0051 + 0,0047}{3} = 0,0049 \text{ mg/kg}$$

- **Taxa de recuperação**

$$R = \frac{0,0080 - 0,0034}{0,0049} \times 100 = 96\%$$

E. Repetibilidade

Para avaliar a repetibilidade do método, aquando da análise de chumbo, foram analisadas 7 réplicas (n) de 13 matrizes (k) pertencentes a 3 grupos alimentares, sendo que uma delas (biscoito) era um DPCS, com a exceção da matriz Maizena 3, em que foram considerados 10 réplicas. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na tabela E.1.

Tabela E.1 – Concentração de chumbo, em mg/kg, dos ensaios realizados para cada matriz em condições de repetibilidade

		[Pb] (mg/kg)									
Grupo	Matriz	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Alimentos para animais	Alimento para gato	1,330	1,415	1,397	1,361	1,402	1,237	1,384	-	-	-
	Ração	1,856	1,858	1,838	1,911	1,823	1,727	1,837	-	-	-
Cereais, leguminosas, pseudo-cereais e derivados	Cevada	0,0996	0,0995	0,1049	0,0997	0,0984	0,1036	0,0999	-	-	-
	Cereal	0,0256	0,0221	0,0245	0,0259	0,0236	0,0270	0,0246	-	-	-
	Biscoito	0,1353	0,1340	0,1371	0,1313	0,1346	0,1303	0,1311	-	-	-
	Farinha de trigo	0,0561	0,0555	0,0595	0,0598	0,0574	0,0584	0,0581	-	-	-
	Maizena 1	0,9440	0,9430	0,9410	0,9130	0,9490	0,9180	0,9240	-	-	-
	Maizena 2	0,4650	0,44	0,4650	0,4310	0,4460	0,47	0,4500	-	-	-
	Maizena 3	0,0161	0,0028	0,0025	0,0036	0,0123	0,0080	0,0060	0,0088	0,0101	0,0728
	Maizena 4	0,0944	0,0911	0,0996	0,0921	0,097	0,0909	0,0971	-	-	-
	Frutos, algas, produtos hortícolas e derivados	Alga	0,1493	0,1535	0,1465	0,1554	0,1487	0,1477	0,1422	-	-
Cacau		0,2839	0,2981	0,2807	0,2692	0,2791	0,2757	0,2854	-	-	-
Pasta de tomate		0,2327	0,2121	0,2235	0,2162	0,2240	0,2259	0,2104	-	-	-

- **Aplicação do teste de *Grubbs***

Realizou-se o teste de *Grubbs* para avaliar a possibilidade de se rejeitar algum valor da concentração de chumbo determinada para os replicados. Os resultados encontram-se na tabela E.2.

Tabela E.2 - Teste de Grubbs

		Teste de Grubbs							
Grupo	Matriz	População	Valor crítico 1%	Valor mínimo	G valor mínimo	Teste ao valor mínimo	Valor máximo	G valor máximo	Teste ao valor máximo
Ração	7	2,1	1,73	2,0	Aceitável	1,9	1,4	Aceitável	
Cevada	7	2,1	0,10	0,98	Aceitável	0,10	1,7	Aceitável	
Cereal	7	2,1	0,020	1,7	Aceitável	0,030	1,4	Aceitável	
Biscoito	7	2,1	0,13	1,2	Aceitável	0,14	1,5	Aceitável	
Cereais, leguminosas, pseudocereais e derivados	Farinha de trigo	7	2,1	0,060	1,4	Aceitável	0,060	1,2	Aceitável
	Maizena 1	7	2,1	0,91	1,4	Aceitável	0,95	1,1	Aceitável
	Maiena. 2	7	2,1	0,43	1,5	Aceitável	0,47	1,0	Aceitável
	Maizena 3	10	2,5	0,00	0,56	Aceitável	0,070	2,8	Alerta
	Maizena 4	7	2,1	0,090	1,1	Aceitável	0,10	1,5	Aceitável
Frutos, algas, produtos hortícolas e derivados	Alga	7	2,1	0,14	1,6	Aceitável	0,16	1,5	Aceitável
	Cacau	7	2,1	0,27	1,4	Aceitável	0,30	1,8	Aceitável
	Pasta de tomate	7	2,1	0,21	1,3	Aceitável	0,23	1,5	Aceitável

Exemplo de cálculo para a realização do teste de *Grubbs* relativo à matriz “alimento para gato”:

$$G = \frac{|1,24 - 1,36|}{0,062} = 2,0$$

- **Aplicação do teste de Cochran**

De modo a avaliar a necessidade de eliminar alguma matriz para o cálculo da repetibilidade do método, realizou-se um teste de *Cochran*, que tem por base a análise das variâncias calculadas para cada matriz utilizada no estudo da precisão. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na tabela E.3.

Tabela E.3 - Teste de Cochran

Teste c de cochran	Número de matrizes:	4	Maior variância:	0,0038	Valor crítico tabelado c_c (5 %): 0,56
	Número de ensaios:	7	C de cochran (calculado):	0,52	
Avaliação:	$C_{calc} < c_{tab}$	Conclusão:		Valor aceite	

- Exemplo de cálculo para a realização do teste C de *Cochran*:

$$C = \frac{w_{max}^2}{\sum_i^k w_i^2} = \frac{0,0038}{(0,0038 + 0,0031 + 0,00020 + 0,00020)} = 0,520$$

- **Cálculo do limite de repetibilidade**

A partir dos resultados apresentados na tabela 3.7., determinou-se o r, para a matriz cereal, para [Chumbo] < 0,10 mg/kg, de acordo com a equação 1.8. isto é:

$$r = 2,8 \times 0,0016 = \mathbf{0,0044 \text{ mg/kg}}$$

- **Cálculo do coeficiente de variação de repetibilidade**

A partir dos resultados apresentados na tabela 3.7., determinou-se o CVr, para a matriz cereal, para [Chumbo] < 0,1 mg/kg, de acordo com a equação 1.9. isto é:

$$CVr = \frac{0,0016}{0,025} \times 100 = \mathbf{6,4\%}$$

- **Cálculo do limite de repetibilidade relativo**

A partir dos resultados apresentados na tabela 3.7., determinou-se o CVr_r, para a matriz cereal, para [Chumbo] < 0,10 mg/kg, de acordo com a equação 1.10. isto é:

$$CVr_r = 2,8 \times 6,4 = \mathbf{18\%}$$

F. Precisão intermédia

A precisão intermédia foi estudada considerando três níveis de trabalho de chumbo. Para o nível baixo, inferior a 0,10 mg/kg, foram considerados os resultados da concentração de chumbo de 20 amostras, obtidos em duplicado, cujos valores se encontram apresentados na tabela F.1. Para os outros níveis de trabalho foi feito este estudo de forma análoga.

Tabela F.1 - Valores auxiliares necessários para a determinação da precisão intermédia no nível de trabalho baixo, $[Pb] < 0,10$ mg/kg, nomeadamente, a concentração de chumbo em dois ensaios, bem como o valor médio obtido, em mg/kg.

Matriz	$[Pb]_A$ (mg/kg)	$[Pb]_B$ (mg/kg)	$([Pb]_A - [Pb]_B)^2$ (mg/kg) ²	\bar{X}	$[Pb]_A - \bar{X}$	$[Pb]_B - \bar{X}$
Cereal	0,039	0,044	0,000023	0,041	-0,0024	0,044
Cereal	0,011	0,010	0,00000036	0,010	0,00030	0,010
Cereal	0,007	0,006	9,0e-08	0,0066	0,00015	0,0064
Farinha de trigo	0,054	0,058	0,000018	0,056	-0,0022	0,058
Farinha de trigo	0,084	0,082	3,2e-06	0,083	0,00090	0,082
Farinha de trigo	0,052	0,048	0,000018	0,050	0,0021	0,048
Farinha de trigo	0,052	0,058	0,000031	0,055	-0,0028	0,058
Farinha de trigo	0,060	0,065	2,9e-05	0,063	-0,0027	0,065
Farinha de trigo	0,047	0,047	9,0e-08	0,047	-0,00015	0,047
Cevada	0,089	0,086	0,000011	0,087	0,0017	0,086
Cevada	0,093	0,098	0,000034	0,095	-0,0029	0,098
Cevada	0,087	0,089	0,0000036	0,088	-0,00095	0,089
Cevada	0,085	0,083	0,0000058	0,084	0,0012	0,083
Cevada	0,085	0,083	1,2e-06	0,084	0,00055	0,083
Cevada	0,064	0,069	2,6e-05	0,067	-0,0025	0,069
Cevada	0,093	0,091	1,9e-06	0,092	0,00069	0,091
Alga	0,097	0,098	1,2e-06	0,097	-0,00055	0,098
Maizena	0,016	0,018	0,0000048	0,017	-0,0011	0,018
Alimento para gato	0,073	0,079	2,75e-05	0,076	-0,0026	0,079
Ração	0,057	0,058	3,35e-06	0,057	-0,00091	0,058
Soma	-	-	0,00024	-	-	-

A partir dos resultados apresentados na tabela F.1., determinou-se o S_i de acordo com a equação 1.11. sabendo que t é igual a 20, isto é:

$$S_i = \sqrt{\frac{1,0}{2,0 \times 20}} \times 0,0024 = \mathbf{0,0020 \text{ mg/kg}}$$

O CV_{PI} foi determinado de acordo com a equação 1.12., sabendo que o S_i corresponde a 0,0020 mg/kg e o valor médio é 0,063 mg/kg, isto é:

$$CV_{PI} = \frac{0,0020}{0,063} \times 100 = \mathbf{3,9\%}$$

O $CV_{r_{PI}}$ foi determinado de acordo com a equação 1.13., sabendo que o S_i corresponde a 0,0020 mg/kg e o valor médio é 0,063 mg/kg, isto é:

$$CV_{r_{PI}} = \frac{2,8 \times 0,0020}{0,063} \times 100 = \mathbf{11\%}$$

G. Justeza

- **Determinação do *z-score***

Para avaliar o desempenho do laboratório na participação de ensaios interlaboratoriais, procedeu-se à determinação do *z-score* em cada um dos ensaios realizados. Tomando como exemplo a matriz de pasta de tomate na análise de chumbo, o *z-score* foi calculado como ilustrado na equação 1.2., sabendo que o desvio padrão do ensaio foi de 80,8 µg/kg, o valor médio de concentração de chumbo na amostra foi de 313 µg/kg e conhecendo o valor de referência de concentração de chumbo na amostra de 447 µg/kg, teve-se que:

$$\mathbf{z - score} = \frac{313 - 447}{80,8} = -1,66$$

H. Seletividade e especificidade

- **Ensaio de recuperação**

Foram realizados diversos ensaios de recuperação de modo a avaliar a presença/ausência de interferências que possam, ou não, interferir com o resultado final. Os ensaios realizados para o chumbo encontram-se representados na tabela H.1.

Tabela H.1 – Ensaios de recuperação para o elemento Pb: Resultados obtidos(mg/kg) para diversas matrizes, sem e com contaminação. * - Resultado não considerado

Sem contaminação (mg/kg)					Com contaminação (mg/kg)										
Metal	Matriz	A	B	Média	Contaminação		Volume (mL)	Resultados	A	B	C	D	E	F	G
Chumbo	Maizena	0,00366	0,00304	0,00335	Conc. mãe (mg/L)	1000,1	100	Massa (g)	0,5085	0,5046	0,5023	0,5100	0,5036	0,5030	0,5112
					Vol. Mãe (mL)	0,0500		Resultado (mg/kg)	0,941	0,913	0,949	0,918	0,924	0,944	0,943
					Conc. sol. (mg/L)	0,500		Resultado teórico (mg/kg)	0,983	0,991	0,996	0,980	0,993	0,994	0,978
					Volume adição (mL)	1,00		%recuperação	95,3	91,8	95,0	93,3	92,7	94,6	96,1
					Fortificação (mg)	0,0005000									
					Conc. mãe (mg/L)	1000,3	100	Massa (g)	0,5258	0,5015	0,5135	0,5199	0,5251	0,5015	0,5218
					Vol. Mãe (mL)	0,125		Resultado (mg/kg)	0,465	0,465	0,431	0,446	0,450	0,466	0,439
					Conc. sol. (mg/L)	1,25		Resultado teórico (mg/kg)	0,476	0,499	0,487	0,481	0,476	0,499	0,479
					Volume adição (mL)	0,200		%recuperação	97,1	92,6	87,8	92,0	93,8	92,8	90,9
					Fortificação (mg)	0,000100									

Sem contaminação (mg/kg)					Com contaminação (mg/kg)										
Metal	Matriz	A	B	Média	Contaminação		Volume (mL)	Resultados	A	B	C	D	E	F	G
Chumbo	Maizena	0,0037	0,0030	0,0034	Conc. mãe (mg/L)	1000,1	500	Massa (g)	0,5138	0,5048	0,5054	0,5434	0,5382	0,5079	0,5392
					Vol. Mãe (mL)	0,200		Resultado (mg/kg)	0,094	0,091	0,100	0,092	0,091	0,097	0,097
					Conc. sol. (mg/L)	0,400		Resultado teórico (mg/kg)	0,097	0,099	0,099	0,092	0,093	0,098	0,093
					Vadição(mL)	0,125		%recuperação	93,6	88,6	97,3	96,5	94,2	95,2	100,6
					Fortificação (mg)	0,000100									
					Conc. Mãe (mg/L)	1000,1	100	Massa (g)	0,5148	0,5338	0,4921	0,5338	-	-	-
					Vol. Mãe (mL)	0,250		Resultado (mg/kg)	0,008	0,006	0,009	0,007	-	-	-
					Conc. Mãe2 (mg/L)	2,50	100	Resultado teórico (mg/kg)	0,005	0,005	0,005	0,005	-	-	-
					Vol. Mãe2 (mL)	1,00		%recuperação	95,5	56,6*	107,8	83,9	-	-	-
					Conc. sol. (mg/L)	0,0250									
					Vadição (mL)	0,100									
					Fortificação (mg)	0,00000250									

Sem contaminação (mg/kg)					Com contaminação (mg/kg)										
Metal	Matriz	A	B	Média	Contaminação		Volume (mL)	Resultados	A	B	C	D	E	F	G
Chumbo	Alimento para gato	0,0734	0,0786	0,0760	Conc. mãe (mg/L)	1000,1	100	Massa (g)	0,5222	0,4780	0,4851	0,5037	0,5417	0,5276	0,4855
					Vol. Mãe (mL)	0,0750		Resultado (mg/kg)	1,330	1,415	1,397	1,361	1,402	1,237	1,384
					Conc. sol. (mg/L)	0,750		Resultado teórico (mg/kg)	1,436	1,569	1,546	1,489	1,385	1,422	1,545
					Volume adição (mL)	1,00		%recuperação	87,3	85,3	85,4	86,3	95,8	81,7	84,7
					Fortificação (mg)	0,00100									
	Ração	0,0566	0,0584	0,0575	Conc. mãe (mg/L)	1000,1	100	Massa (g)	0,4933	0,4851	0,4877	0,4966	0,5135	0,5282	0,5445
					Vol. Mãe (mL)	0,100		Resultado (mg/kg)	1,856	1,858	1,838	1,911	1,823	1,727	1,837
					Conc. sol. (mg/L)	1,00		Resultado teórico (mg/kg)	2,027	2,062	2,051	2,014	1,948	1,893	1,837
					Volume adição (mL)	1,00		%recuperação	88,7	87,3	86,8	92,0	90,7	88,2	96,9
					Fortificação (mg)	0,00100									

- **Determinação da percentagem de recuperação média**

A partir dos dados da tabela H.1. foi possível determinar a taxa de recuperação média para cada metal. Assume-se como exemplo os ensaios de recuperação realizados para o chumbo. O resumo dos resultados obtidos e a média dos mesmos encontra-se na tabela H.2.

Tabela H.2 – Taxa de recuperação (%) do chumbo em várias matrizes e respetiva média.

Chumbo		
GRUPO	Matriz	Recuperação (%)
Alimentos para animais	Alimento para gato	86,6
	Ração	90,1
	Cevada	-
Cereais, leguminosas, pseudocereais e derivados	Farinha de trigo	-
	Maizena 1	94,1
	Maizena 2	92,4
	Maizena 3	96,2
	Maizena 4	95,1
Frutos, algas, produtos hortícolas e derivados	Cacau	-
	Pasta de tomate	-
Média		92,4

- **Determinação da recuperação média aparente**

Na tabela H.3. estão presentes os resultados de chumbo relativos aos ensaios realizados sobre a matriz cacau, bem como a média dos mesmos e a gama de valores aceitável para essa mesma matriz.

Tabela H.3 – Resultados de chumbo (µg/kg) para a matriz cacau, a respetiva média e valores aceitáveis para a mesma.

Elemento	Resultados (µg/kg)							Média	Avaliação dos circuitos
	1	2	3	4	5	6	7		
Chumbo	284	298	281	269	279	276	285	282	198 a 366

$$\text{Recuperação aparente (\%)} = \frac{282}{\frac{198 + 366}{2}} = 99,9 \%$$

I. Estimativa da incerteza do método

Os exemplos de cálculo explícitos neste capítulo referem-se à estimativa da incerteza associada ao chumbo para $[Chumbo] > 0,40$ mg/kg.

- **Estimativa da incerteza associada à componente da precisão**

A $u_{(precisão)relativa}$ foi estimada através do CV_{PI} determinado no estudo da precisão intermédia do método e, correspondeu a 2,3 %.

- **Estimativa da incerteza associada à componente da justeza**

Para se estimar a $u_{(justeza)relativa}$ no nível de trabalho de $[Chumbo] > 0,40$ mg/kg, determinou-se, em primeiro lugar, o *bias* relativo, sabendo que após realização do ensaio de recuperação, a $[\overline{Pb}]_{obs}$ foi de 1,39 mg/kg e a $[Pb]_{teo}$ é de 1,51 mg/kg, isto é:

$$bias\ relativo = \frac{|1,39 - 1,51|}{1,51} \times 100 = 8,34 \%$$

Para determinar a $u_{(add)relativa}$, considerou-se a u_{add} que foi de 0,0080 mg/kg e a $[Pb]_{add}$ que equivaleu a 0,075 mg/kg, isto é:

$$u_{(add)relativa} = \frac{0,0080}{0,075} \times 100 = 1,1 \%$$

Para determinar a $u_{(Vol)relativa}$, considerou-se a u_{Vol} que foi de 0,61 mL e o V_{add} que equivaleu a 1000 mL isto é:

$$u_{(Vol)relativa} = \frac{0,61}{1000} \times 100 = 0,10 \%$$

Para determinar a $u_{(recuperação,c)relativo}$, combinou-se a $u_{(add)relativa}$ com a $u_{(Vol)relativa}$ dado que estas se apresentam nas mesmas unidades e teve-se que:

$$u_{(recuperação,c)relativo} = \sqrt{1,1^2 + 0,10^2} = 1,1 \%$$

De seguida, calculou-se a $u_{(justeza)relativa}$ combinando o *bias* relativo com a $u_{(recuperação,c)relativo}$, isto é:

$$u_{(justeza)relativa} = \sqrt{8,3^2 + 1,1^2} = 8,4 \%$$

- **Estimativa das incertezas combinada e expandida**

Calculou-se a $u_c(y)$ do nível de trabalho alto, combinando a $u_{(\text{precisão})\text{relativa}}$ com a $u_{(\text{justeza})\text{relativa}}$, isto é:

$$u_c(y) = \sqrt{2,3^2 + 8,4^2} = \mathbf{8,7 \%}$$

e, a U , ou seja:

$$U = 8,7 \times 2 = \mathbf{17 \%}$$