

INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DO PORTO

MESTRADO EM ENGENHARIA QUÍMICA
RAMO TECNOLOGIAS DE PROTECÇÃO AMBIENTAL



Análise de metais em infusões de chás e ervas aromáticas por espectrofotometria de absorção atómica de alta resolução com fonte contínua

José Camilo Carvalhinho Sousa Pinto

Novembro de 2010

Orientador: Maria Teres Pereira de Oliva Teles Moreira

Co-Orientador: Susana Maria Ribeiro e Sousa Mendes de Freitas

Agradecimentos

Ao Isep pela oportunidade de realização da tese.

Ao GRAQ (Grupo de Reacção e Análises Químicas) e em especial á Dr.^a Cristina Delerue-Matos pelos equipamentos usados e elementos necessários e disponíveis, assim como toda a ajuda prestada.

Às Drs. Teresa Oliva Teles e Susana Sousa, minha orientadora e co-orientadora, pela paciência e orientação que me proporcionaram ao longo de todo este processo. Sem elas, este trabalho, não seria possível.

A todos os elementos do GRAQ pela disponibilidade e amabilidade ao longo de todo o trabalho experimental que lá realizei.

Aos amigos que me ajudarem e apoiaram nos momentos mais difíceis e críticos, vocês sabem quem são.

Para finalizar gostaria também de agradecer, de forma não menos importante, aos meus pais, pela possibilidade e apoio fornecidos para usufruir deste trabalho tão valorizante para a minha vida futura.

A todos, o meu muito obrigado.

Resumo

Actualmente tem-se verificado um grande aumento na procura e a utilização de produtos naturais contendo extractos de algas, com fins medicinais, sendo cada vez maior a diversidade de oferta desses produtos, vendidos em ervanária e afins. A bibliografia tem mostrado que as algas têm capacidade de acumulação de metais pesados. As algas, sendo organismos aquáticos, estão sujeitas a contaminações dos locais (não identificados) de onde provêm. O controlo e fiscalização para estes produtos é praticamente inexistente.

O objectivo deste projecto foi o desenvolvimento de metodologias analíticas com vista à quantificação de metais em infusões de chás e ervas aromáticas. Foram analisadas 9 amostras: uma de chá verde, uma de chá preto, uma infusão de lima, uma de camomila, uma mistura de chá com ervas e quatro misturas contendo algas.

A espectrofotometria de absorção atómica é o método de referência para a análise de metais. Neste trabalho foi utilizado um espectrofotómetro de absorção atómica com fonte de radiação contínua e monocromador de alta resolução. Sendo esta uma tecnologia inovadora foi necessário desenvolver metodologias para os métodos de análise. A atomização em chama foi a técnica utilizada para a quantificação do cálcio, potássio, magnésio, manganês e sódio. A atomização electrotérmica foi usada para o cádmio, cobalto, crómio, cobre, níquel e chumbo.

Tendo em conta os limites legislados (Decreto-Lei Nº306/2007 de 27 de Agosto) obtiveram-se teores preocupantes para o níquel (iguais ou superiores ao limite legislado) em todas as amostras analisadas e para o manganês em duas das amostras (chá verde e chá preto).

Todas as amostras contendo algas apresentaram teores de Ca, Mg e Na superiores aos das restantes. Para os restantes elementos não foi possível relacionar as concentrações com a composição das infusões, em particular a presença de algas.

Abstract

Nowadays there has been a large increase in the demand and use of natural herbal products containing extracts of seaweed, with medicinal purposes, with an increase in the offering and diversity in these products sold by herbal physicians and alike. The literature has shown that seaweed have the ability of accumulating heavy metals. Algae, being aquatic organisms, are subject to contaminations from unidentified places from which they come from. The control of these types of products is practically inexistent.

The objective of this thesis was the development of analytical methodologies for the quantification of heavy metals in infusions of tea and herbs. We analyzed nine samples: one of green tea, one of black tea, one lime infusion, one chamomile infusion, one mixture of tea and herbs and four mixtures containing seaweed.

The atomic absorption spectroscopy is the reference method for the analysis of metals. In this work it was used an atomic absorption spectrometer with a continuum source of radiation and high resolution monochromator. Being this a breakthrough technology, it was necessary to develop methodologies for the analysis method. The flame atomization was used to quantify calcium, potassium, magnesium, manganese and sodium. The elements cadmium, cobalt, chromium, copper, nickel and lead were determined by electrothermal atomization.

Given the legislation limits (Executive Order nº 306/2007 from 27 of August of the Portuguese Legislation) there have been obtained worrying levels for nickel (equal or above the legislation) in all of the samples analyzed and for manganese in two of the samples (Green and Black tea).

All of the samples containing seaweed have presented higher levels of Ca, Mg and Na than the other samples analyzed. For the remaining elements, it was not possible to determine the relation of the concentration with the composition of the infusions, in particular with the presence of seaweed.

Abreviaturas

|| - Concentração

a,b,c - Parâmetros de regressão linear ou quadrática

AAS - Espectrofotometria de absorção atómica (*Atomic Absorption Spectrophotometry*)

a_w , b_w - Parâmetros da regressão linear ponderada

CS-AAS - Espectrofotómetro de absorção atómica de fonte contínua (*Continuous Source - Atomic Absorption Spectrophotometry*)

DS^2 - Diferença de variâncias

EGCG - (-)-epigallocatequinas 3-galato

F - Teste de F-Fisher

F.D. – Factor de Diluição

F-CS-AAS - Espectrofotómetro de absorção atómica com atomização por chama com fonte conínua (*Flame-Continuous Source- Atomic Absorption Spectrophotometry*)

GF-CS-AAS - Espectrofotómetro de absorção atómica com atomização electrotérmica com fonte contínua (*Graphite Furnace -Continuous Source- Atomic Absorption Spectrophotometry*)

HR-CS-AAS - Espectrofotómetro de absorção atómica de alta resolução com fonte contínua (*High Resolution Continuous Source Atomic Absorption Spectrophotometry*)

LD - Limite de detecção

LDL - Lipoproteínas de baixa densidade (*Low Density Lipoproteins*)

LQ - Limite de quantificação

LS-AAS - Espectrofotómetro de absorção atómica com fonte de linha (*Linear source-Atomic Absorption Spectrophotometry*)

n - Número de níveis de concentração

ppb - Partes por bilião ($\mu\text{g/L}$)

ppm - Partes por milhão (mg/L)

ROS – Espécies reactivas de oxigénio (*Reactive Oxygen Species*)

RSD - Desvio padrão relativo (*Relative standard deviation*)

REC – Recuperação

S_a - Desvio padrão da interceptação com a origem da regressão linear

S_b - Desvio padrão do declive

SS_{res} - Somatório dos quadrados dos resíduos (*Sum of Squares of the Residuals*)

S_{x_0} - Desvio padrão do método

S_y - Desvio padrão da regressão

$S_{x_{0w}}$ - Desvio padrão do método da regressão linear ponderada

S_{y_w} - Desvio padrão da regressão linear ponderada

V_{x_0} - Coeficiente de variação do método

w - Peso ponderado

\bar{x}_w - Valor médio de x ponderado

x - Concentração de uma solução padrão/amostra

\bar{x} - Valor médio de concentração de uma solução padrão/amostra

y - Concentração de uma amostra/padrão analisado

\hat{y} - Valor padrão de y calculado pela função de calibração

\bar{y}_w - Valor médio de y ponderado

\hat{y}_w - Valor padrão de y calculado pela função de calibração linear ponderada

Índice

1 - Introdução.....	1
1.1 - A origem do chá.....	1
1.2 - Tipos de chás e ervas aromáticas.....	2
1.3 - Constituição química do chá.....	3
1.4 - Potenciais benefícios do chá na saúde.....	4
1.5 - Algas e sua utilização em infusões.....	5
1.6 - Os minerais e a saúde.....	7
1.7 - Legislação.....	9
1.8 - Análise de metais por Espectrofotometria de absorção atómica.....	10
1.9 - Validação do método de análise.....	14
1.10 - Objectivo do estudo.....	15
2 - Parte Experimental.....	17
2.1 - Material e Equipamento.....	17
2.2 - Reagentes.....	18
2.3 - Preparação de soluções padrão.....	19
2.4 - Preparação das amostras.....	20
2.5 - Procedimento experimental.....	21
2.6 - Validação do método.....	23
2.6.1 - Regressão Linear.....	23
2.6.2 - Regressão Linear Ponderado.....	24
2.6.3 - Regressão Quadrática.....	26
3 - Resultados e Discussão.....	27
3.1 - Análises dos metais por atomização em chama.....	27
3.1.1 - Cálcio.....	27
3.1.2 - Potássio.....	28
3.1.3 - Magnésio.....	30
3.1.4 - Manganês.....	32
3.1.5 - Sódio.....	33
3.1.6 - Resumo dos métodos de análise.....	35
3.2 - Atomização electrotérmica.....	35
3.2.1 - Cobalto.....	36
3.2.2 - Crómio.....	37
3.2.3 - Cobre.....	39
3.2.4 - Níquel.....	40
3.2.5 - Chumbo.....	42

3.2.6 - Cádmio.....	43
3.3 - Concentrações dos metais nos extractos de chás e infusões.....	45
3.3.1 - Atomização por chama.....	46
3.3.2 - Atomização electrotérmica	48
3.3.2.1 - Cobalto	48
3.3.2.2 - Crómio.....	49
3.3.2.3 - Cobre.....	51
3.3.2.4 - Níquel.....	53
3.3.2.5 - Cádmio e Chumbo.....	54
3.3.3 - Considerações finais	55
4 - Conclusões e sugestões para trabalho futuro	57
5 - Bibliografia	59
Anexo A – Curvas de Calibração do Cobalto.....	63
Anexo B – Curvas de calibração do Crómio	67
Anexo C – Curvas de calibração do Cobre.....	71
Anexo D – Curvas de calibração do Níquel	73

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 - Algas autorizadas em França para consumo humano. [27]	7
Tabela 1.2 - Principais características relacionadas com a ingestão de macronutrientes analisados. [30,33-43].....	8
Tabela 1.3 - Principais características associadas à ingestão de alguns micronutrientes e nutrientes vestigiários analisados. [30,34,44-48].....	9
Tabela 1.4 - Valores paramétricos de alguns elementos constantes no Decreto-Lei 306/2007 de 27 de Agosto, referente a água destinada ao consumo humano. [49] ..	9
Tabela 1.5 - Diferenças instrumentais entre um LS-AAS e um CS-AAS. [50-51, 53-54].....	14
Tabela 2.1 - Preparação de soluções padrão para análises por F-CS-AAS.	19
Tabela 2.2 - Preparação de soluções padrão para GF-CS-AAS.....	20
Tabela 2.3 - Caracterização das amostras.	20
Tabela 2.4 - Programa de digestão otimizado para as amostras. [60]	21
Tabela 2.5 - Parâmetros instrumentais utilizados na análise por F-CS-AAS cada elemento.	22
Tabela 2.6 - Parâmetros de optimização do programa de temperaturas, tempos e modificadores usados para cada elemento.	22
Tabela 3.1 - Parâmetros experimentais para avaliação do método de regressão para traçado da curva calibração do Ca.	28
Tabela 3.2 - Parâmetros experimentais para avaliação do método de regressão para traçado da curva calibração do K.	29
Tabela 3.3 - Parâmetros experimentais para avaliação do método de regressão para traçado da curva calibração do potássio para uma gama de absorvância até 0,2. ..	30
Tabela 3.4 - Parâmetros experimentais para avaliação do método de regressão para traçado da curva calibração do Mg.....	31
Tabela 3.5 - Parâmetros experimentais para avaliação do método de regressão para traçado da curva calibração do Mg para uma gama de absorvância inferior.	32
Tabela 3.6 - Parâmetros experimentais para avaliação do método de regressão para traçado da curva calibração do Mn.....	33
Tabela 3.7 - Parâmetros experimentais para avaliação do método de regressão para traçado da curva calibração do Na.	34
Tabela 3.8 - Resumo dos métodos de análise utilizados por F-CS-AAS.	35

Tabela 3.9 - Parâmetros experimentais para avaliação do método de regressão para traçado da curva calibração do Co.	37
Tabela 3.10 - Parâmetros experimentais para avaliação do método de regressão para traçado da curva calibração do Cr.	38
Tabela 3.11 - Parâmetros experimentais para avaliação do método de regressão para traçado da curva calibração do Cu.	39
Tabela 3.12 - Parâmetros experimentais para avaliação do método de regressão para traçado da curva calibração do Ni.	41
Tabela 3.13 - Parâmetros experimentais para avaliação do método de regressão para traçado da curva calibração do Pb.	43
Tabela 3.14 - Parâmetros experimentais para avaliação do método de regressão para traçado da curva calibração do Cd.	44
Tabela 3.15 - Parâmetros experimentais para avaliação do método de regressão para traçado da curva calibração do Cd para uma gama de absorvância inferior....	45
Tabela 3.16 – Concentrações (ppm) das soluções amostras analisadas por F-CS-AAS e respectivos factores de diluição (F.D.).....	46
Tabela 3.17 - Percentagens de recuperação (e respectivos RSD%) para as amostras analisadas por F-CS-AAS.	47
Tabela 3.18 – Concentração de Co em soluções amostra antes e após digestão, e respectivos RSD por GF-CS-AAS.	48
Tabela 3.19 - Concentração de Co nas amostras (sem digestão) por GF-CS-AAS.	49
Tabela 3.20 - Concentração de Cr (e respectivos RSD) em soluções amostra, antes e após digestão por GF-CS-AAS e resultados dos ensaios de recuperação.	50
Tabela 3.21 - Concentração de Cr em infusões (não digeridas) de algumas amostras por GF-CS-AAS.	50
Tabela 3.22 - Concentração de Cu em infusões após digestão (e respectivos RSD de três réplicas) e em infusões antes da digestão.	51
Tabela 3.23 - Análises por GF-CS-AAS de Cu em infusões de chás não digeridas.	52
Tabela 3.24 - Concentração de Ni em infusões após a digestão (e respectivos RSD de três réplicas) e em concentrações infusões antes da digestão.	53
Tabela 3.25 - Análises por GF-CS-AAS de Ni em infusões de chás não digeridas..	53
Tabela 3. 26 - Resultados experimentais para os vários elementos analisados	55

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Exemplo da fórmula de estrutura de alguns tipos de catequinas. [15]	3
Figura 1.2 – Esquema de espectrofotómetro de absorção atómica de fonte contínua. [52].....	11
Figura 1.4 - Análise de cobre numa amostra por atomização electotérmica no espectrofotómetro de absorção atómica de fonte contínua (GF-CS-AAS):.....	12
Figura 1.5 – Banda molecular no espectro tridimensional obtido na análise de Pb numa amostra de chá.....	13
Figura 2.1 - Microondas MarsX da CEM Corporation.	17
Figura 2.2 – Espectrofotómetro de absorção atómica ContrAA700 da Analytik Jena.	18
Figura 3.1 – (a) Curva de calibração para o Ca e (b) gráfico dos resíduos.	28
Figura 3.2 - (a) Curva de calibração para o K e (b) gráfico dos resíduos.....	29
Figura 3.3 - (a) Curva de calibração para o Mg e (b) gráfico dos resíduos.	31
Figura 3.4 - (a) Curva de calibração para o Mn e (b) gráfico dos resíduos.	33
Figura 3.5 - (a) Curva de calibração para o Na e (b) gráfico dos resíduos.....	34
Figura 3.6 - (a) Curva de calibração para o Co e (b) gráfico dos resíduos.....	36
Figura 3.7 - (a) Curva de calibração para o Cr e (b) gráfico dos resíduos.	38
Figura 3.8 - (a) Curva de calibração para o Cu e (b) gráfico dos resíduos.....	39
Figura 3.9 - (a) Curva de calibração para o Ni e (b) gráfico dos resíduos.	41
Figura 3.10 - (a) Curva de calibração para o Pb e (b) gráficos dos resíduos.	42
Figura 3.11 - (a) Curva de calibração para o Cd e (b) gráfico dos resíduos.....	43
Figura 3.12 - Concentrações de metais nas amostras por F-CS-AAS.	47
Figura 3.13 - Concentração de Co nas infusões de chás e ervas aromáticas por GF-CS-AAS.....	49
Figura 3.14 - Concentração de Cr nas infusões de chás e ervas aromáticas por GF-CS-AAS.....	51
Figura 3.15 - Concentração de Cu nas infusões de chás e ervas aromáticas por GF-CS-AAS.....	52
Figura 3.16 - Concentração de Ni nas amostras (infusões sem digestão ácida) por GF-CS-AAS.	54

1 - Introdução

A Química teve sempre um papel fundamental na evolução das sociedades, desde a melhoria da saúde e aumento da esperança de vida do Homem até a um aumento no conforto da população mundial. Os efeitos dos químicos produzidos pelo homem são ubíquos e, em muitas situações, com um papel positivo. Sem a Química não teríamos por exemplo medicamentos, computadores, automóveis ou fibras sintéticas. No entanto, com o desenvolvimento industrial, cresceram os problemas de poluição ambiental, pela produção e emissão de elevadas quantidades de resíduos tóxicos para o meio ambiente. O aumento populacional e a prosperidade desde a revolução industrial carregaram o meio ambiente com substâncias químicas, resultando um planeta com sérias dificuldades em geri-las.

A poluição pode afectar os seres humanos directamente ou indirectamente, por exemplo, por inalação de ar contaminado, ou através da poluição de água e solos utilizados na agricultura. A ingestão de alimentos contaminados é a principal via de entrada de substâncias estranhas aos organismos vivos e uma fonte de exposição a elementos tóxicos.

Os metais são constituintes essenciais para o desenvolvimento humano, mas tornam-se prejudiciais à saúde se estiverem presentes no organismo em doses elevadas, promovendo o aparecimento de patologias. O teor dos metais pesados tem particular importância atendendo às respectivas propriedades tóxicas e cumulativas no organismo, tais como cefaleias ou perturbações no sistema nervoso central.

A utilização de algas na alimentação está bastante generalizada, mas é necessário atender a que as algas são propícias à bioacumulação de metais. [1,2]

1.1 - A origem do chá

Vários especialistas acreditam que o chá remonta a mais de 5000 anos e com origem na China. [3,4]. Inicialmente o chá era uma bebida utilizada unicamente com fins medicinais. Nos últimos 2000 anos esta bebida ganhou uma maior notoriedade em todo o mundo, sendo a bebida não alcoólica mais consumida, apenas ultrapassada pela água [3,5]. Estima-se que sejam bebidas 500 mil milhões de chávenas de chá por ano e uma média de 100 chávenas de chá por pessoa. [4] O seu consumo foi introduzido pelo mundo fora por comerciantes e viajantes, que

transportavam o seu hábito de consumo, durante as suas viagens. Esta bebida tornou-se de tal forma importante, que assumiu um papel crucial nalgumas culturas, por exemplo no Japão através da cerimónia do chá ou através do inconfundível ritual britânico do “chá das 5”. [6]

Para além de factores históricos e de baixo custo pode-se referir que o consumo de chá está associado ao seu agradável sabor, ao efeito estimulante, mas também pelos comprovados benefícios na saúde. [7-9] Um consumo diário de chá, conjugado com um estilo de vida saudável e uma boa dieta alimentar, ajudam na prevenção de doenças. [3-6] Pode-se salientar que o chá está associado à diminuição dos processos inflamatórios, ao combate contra o cancro e doenças cardiovasculares, bem como a eliminação de toxinas do organismo e reforço do sistema imunitário. [7,9-11]

1.2 - Tipos de chás e ervas aromáticas

O chá é, tradicionalmente, a infusão resultante da planta *Camellia sinensis*, que segundo diferentes métodos de processamento e nível de desenvolvimento das folhas aquando da colheita, dão origem a diferentes grupos de chás. Existem vários tipos de chás consumidos podendo ser divididos em diferentes grupos: chá preto, vermelho (*Pu-erh*), *oolong* (também denominado de *wu long*), verde e branco. O chá preto é um tipo de chá totalmente fermentado, enquanto o chá vermelho e *oolong* são apenas semi-fermentados. O chá verde não é processado (as folhas são apenas secas) e o branco é colhido ainda com os botões das folhas presentes, com tricomas brancos. Este último tipo de chá pode ser semi-fermentado ou não ter qualquer tipo de fermentação. [3]

Existe ainda outras infusões a que se dá vulgarmente o nome de chá apesar de não terem origem na *Camellia sinensis*. Como exemplo, podemos referir as infusões de ervas aromáticas ou tisanas, que poderão ter origem em várias plantas, ervas ou flores como camomila (*Matricaria recutita*), rooibos (*Aspalathus linearis*), ginseng ou chá-mate (proveniente de folhas secas de *Ilex paraguariensis*). [3]

Para os tipos de chás referidos existem pequenas variações na sua composição, através da adição de extractos de óleos, pétalas de flores, frutos ou algas, que conferem à infusão um aroma agradável e permitem variações no seu sabor. Ao mesmo tempo alguns destes aditivos permitem potenciar os efeitos benéficos para a saúde. Pode-se dar o exemplo do chá *Earl-Grey* que é preparado a

partir de chá preto ao qual é adicionado um extracto de óleo proveniente da casca de laranja de bergamota (*Citrus bergamia*).

Actualmente o chá preto corresponde a 78 % do consumo mundial, enquanto o verde corresponde a 20 %. [4] Enquanto no Oriente e no norte de África o tipo de chá mais bebido é o chá verde, noutros locais como a Inglaterra, Irlanda ou Canadá o tipo de chá mais consumido é por sua vez o chá preto. O consumo de chá gelado é um hábito originário dos Estados Unidos, onde o seu consumo chega a rondar os 75 % da totalidade de chá consumido neste país. [12]

1.3 - Constituição química do chá

O chá é constituído em média por 25-35 % de polifenóis, 20 % de proteínas e aminoácidos, 3-5 % de cafeína, 5 % de iões inorgânicos e 30 % de outras substâncias incluindo carboidratos e lípidos. [4,13-14]

Os flavonóides são os polifenóis maioritários na composição do chá, em especial do chá verde, sendo principalmente encontrados sob a forma de catequinas. Os principais tipos de catequinas presentes no chá são: (-)-epicatequina (EC); (-)-epicatequina 3-galato (ECG); (-)-epigallocatequina (EGC) e (-)-epigallocatequinas 3-galato (EGCG). Na Figura 1.1 apresentam-se as fórmulas de estrutura de alguns tipos de catequinas.

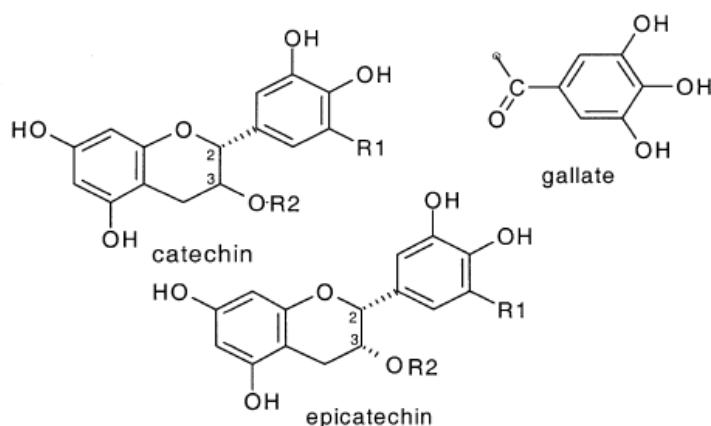


Figura 1.1 - Exemplo da fórmula de estrutura de alguns tipos de catequinas. [15]

As catequinas, conferem ao chá poder anti-oxidante, são solúveis em água e contribuem para o sabor amargo de alguns chás. A proporção de catequinas encontradas no chá verde varia muito, dependendo da localização geográfica do crescimento do chá e do processo de fabricação do chá. Também podem ser

encontrados outros flavonóides no chá, como por exemplo a Quercetina, Glicosídeos de *Kaempferol*. [16-17] As infusões de chá verde contêm uma média de 90 mg de catequinas por chávena, tornando-se uma importante fonte de flavonóides.

A cafeína (3 a 5 %) também está presente no chá [16-17] bem como quantidades baixas de metilxantinas, teobrominas e teofilinas.

As folhas de chá contêm enzimas activas que oxidam os polifenóis e catalisam a oxidação aeróbia das catequinas quando a estrutura das células são destruídas, durante a confecção da infusão. Durante a oxidação enzimática são produzidos vários quininos, dos quais resultam, por oxidação, compostos como teoflavinas que conferem o sabor característico bem como a cor característica de alguns chás como o preto. Muitos destes compostos formam complexos com a cafeína presente no chá. [17-19]

Estão ainda presentes nos chás outras substâncias como proteínas, vitaminas e lípidos. Pode-se ainda salientar a presença de nutrientes como Cálcio, Sódio, Potássio, Crómio, Ferro, Magnésio ou Manganês, bem como alguns contaminantes como o Alumínio ou o Chumbo.

1.4 - Potenciais benefícios do chá na saúde

O chá tem uma longa história como remédio popular, mas os seus benefícios e propriedades medicinais têm vindo a ser estudados, principalmente nos últimos 20 anos, estando essencialmente associados às propriedades antioxidantes do chá. [9]

Os polifenóis, com grande peso na composição média dos chás e elevada capacidade antioxidante, protegem as células contra efeitos adversos de espécies reactivas ao oxigénio (ROS, *reactive oxygen species*). Por exemplo, o radical superóxido ou o radical hidroxilo causam destruição celular, bem como disfunção celular através de danos nos lípidos, proteínas e ácidos nucleicos. Os efeitos dos polifenóis contribuem também como quelantes de iões metálicos. Por exemplo, baixam a absorção de ferro ingerido, balanceando o ferro no organismo, baixam os níveis de cobre e protegem as lipoproteínas de baixa densidade da peroxidação. [6]

Estudos realizados em animais mostraram que extractos de chá verde e os seus polifenóis provocam um efeito inibidor na formação e desenvolvimento de tumores da pele, pulmão, cavidade oral, esófago, estômago, cólon, intestino, fígado, pâncreas, bexiga, glândula mamária e próstata. Além de impedir a proliferação celular, promovem a apoptose, modulando a transdução de sinalização, podendo também inibir a angiogénese e a metastização. [6-7, 20-22]

O facto de catequinas serem rápida e extensivamente metabolizadas no organismo, aumenta a necessidade de comprovar a sua actividade antioxidante *in vivo*. Nos seres humanos, observou-se um pequeno aumento transitório da capacidade antioxidante do plasma após o consumo de chá e catequinas do chá verde [9]. Os seus efeitos parecem muito promissores em modelos animais, no entanto os dados sobre biomarcadores de stress oxidativo *in vivo* em humanos são ainda escassos. [21]

Um dos mecanismos propostos na protecção de doenças cardiovasculares está relacionado com a inibição da oxidação das proteínas de baixa densidade (LDL, *Low Density Lipoproteins*) envolvidas no desenvolvimento de arteriosclerose. O consumo de chá está assim relacionado com a diminuição da concentração total de colesterol e consecutivamente com a diminuição da proporção das LDL. Vários estudos mostraram que o consumo de extractos de chá contendo EGCG reduz um dos marcadores de lipoproteínas oxidadas, sugerindo assim que as EGCG são oxidantes poderosos que diminuem o risco de doenças coronárias. Estudos mostraram que pessoas que ingerem mais de 10 chávenas de chá por dia tinham níveis menores de colesterol, e um aumento de LDL. [6] Um outro estudo efectuado durante cerca de doze semanas em indivíduos com altos valores de colesterol, mostrou que o consumo de chá preto reduz o risco de acidentes vasculares até 16 % do nível de colesterol corroborando outros estudos efectuados. [11, 15]

Várias preparações de chá são usadas pela medicina Chinesa como forma de tratamento e prevenção de diabetes. Dufresne CJ et al. [6] administrou extractos de chá a ratinhos tendo verificado que os animais estavam protegidos dos danos pancreáticos causadores de diabetes que tinham sido induzidos experimentalmente. Desta forma e apesar de apenas experimentais, tais resultados levam a crer que estes chás podem ser usados como parte da nutrição de pacientes com diabetes.

Para além destes exemplos, deve-se ainda salientar os benefícios demonstrados pelos chás na prevenção de obesidade, aumento da longevidade de vida, tratamento de osteoporose, artrites e inflamações bem como benefícios neurológicos. [6]

1.5 - Algas e sua utilização em infusões

As algas marinhas macroscópicas ou macroalgas constituem um alimento rico em proteínas, minerais, vitaminas entre outros nutrientes específicos como ácidos gordos polinsaturados. Estas fornecem aos seres humanos muitos dos

elementos e oligo-elementos necessários à sua dieta. Devido a estes factores, considera-se que as algas são benéficas à saúde humana, sendo muito usadas em países orientais, como a Coreia, China ou o Japão, e com crescente utilização no resto do mundo. [1] Hoje em dia as algas são usadas como constituintes de vários alimentos como por exemplo chás, compotas, massas e bolachas, devido à capacidade de obtenção de agar-agar (poderoso espessante e gelificante natural), substituindo assim aditivos químicos. [24] Podem ainda ser usadas em produtos farmacêuticos. [2]

No entanto, as algas possuem uma grande afinidade a metais por bioacumulação. Por um lado, ocorre uma reacção de superfície na qual os metais são adsorvidos através de atracções electrostáticas. Este mecanismo é independente de factores que influenciam o metabolismo das algas como temperatura, pH e luz, mas é influenciado pela relativa abundância de elementos no ambiente de crescimento das algas. [23,25] Num segundo mecanismo, a acumulação activa é mais lenta, e os iões metálicos são transportados através da parede da membrana para o citoplasma. Este mecanismo está mais dependente de processos metabólicos e sugere ser mais relevante para elementos como o Cu, Mn, Se e Ni. Neste processo mudanças de temperatura, pH, luz e idade da planta interferem com a acumulação dos metais. [26]

Os tipos de algas mais comuns são as macroalgas castanhas, vermelhas ou verdes sendo as primeiras as mais usadas a nível alimentar. [2] Por norma as algas verdes, devido às diferenças presentes na parede celular, têm menor capacidade de acumulação de metais comparativamente com às algas castanhas. Estas últimas são, aparentemente, incapazes de regular a acumulação de metais devido a uma grande quantidade de compostos na sua parede celular, como ácidos algínicos e proteínas. [26]

As algas têm a capacidade de acumulação de 10^4 da quantidade de metais presente na água, [2] estando a sua concentração fortemente relacionada com parâmetros ambientais, como a salinidade, concentração de nutrientes e oxigénio. [26] Tem sido referido que as concentrações de metais nas algas são geralmente mais baixas no Verão.

Esta grande afinidade a metais e a ausência de conhecimento da origem das algas, impõe o controlo de metais em alimentos contendo algas. Surpreendentemente não há muita legislação na União Europeia sobre esta matéria. A França é um dos países com legislação para o uso de algas em alimentação, sendo autorizados vários tipos de macro e microalgas que se apresentam na Tabela 1.1. [27]

Tabela 1.1 - Algas autorizadas em França para consumo humano. [27]

Tipo de Alga	Nome
Algas castanhas	<i>Ascophyllum nodosum</i> <i>Fucus vesiculosus</i> <i>Fucus serratus</i> <i>Himanthalia elongata</i> <i>Undaria pinnatifida</i>
Algas vermelhas	<i>Porphyra umbilicalis</i> <i>Palmaria palmata</i> <i>Cracilaria verrucosa</i> <i>Chondrus crispus</i>
Algas verdes	<i>Ulva spp.</i> <i>Enteromorpha</i>
Microalgas	<i>Spirulina</i> <i>Odontella aurita</i>

Das algas legisladas em França são estabelecidos limites nos teores de alguns metais. De referir, 3 mg/kg para o Arsénio inorgânico, 5 mg/kg para o Chumbo, 0,5 mg/kg para o Cádmiu, 0,1 mg/kg para o Mercúrio e 5,0 mg /kg para o Iodo. Todos estes valores referem-se à matéria seca resultante do processamento das algas. [27]

1.6 - Os minerais e a saúde

Os seres vivos, necessitam de minerais em quantidades definidas, para a realização de funções vitais no organismo. De acordo com a quantidade necessária, podemos dividi-los em macro, micro ou nutrientes vestigiários. Os metais Ca, Mg, Na, K e os não metais P, S e Cl são macronutrientes uma vez que são necessários numa quantidade da ordem dos 100 miligramas por dia. Os micronutrientes, são necessários ao organismo em quantidades mais baixas da ordem de alguns miligramas por dia sendo exemplo, o Fe, o Zn, e o Se. Os nutrientes vestigiários (As, B, Cd, Co, Cr, Cu, F, Li, Mn, Mo, Ni, Pb, Si, Sn e V) são assim denominados pois só são necessários em quantidades vestigiárias. [28-29] As funções destes nutrientes são vastas, mas em alguns casos o limite entre a quantidade necessária ao organismo e a sua toxicidade são muito ténues. [30] Nas Tabela 1.2 e Tabela 1.3 são apresentadas as principais funções biológicas, sintomas de deficiência/patologia e toxicidade de alguns nutrientes minerais. Os elementos referidos nas tabelas são alguns dos elementos analisados nos chás.

Tabela 1.2 - Principais características relacionadas com a ingestão de macronutrientes analisados. [30,33-43]

	Funções Biológicas	Deficiência	Toxicidade
Cálcio	<ul style="list-style-type: none"> - Componente de ossos e dentes - Essencial nas funções neurológicas e contracção cardíaca. 	<ul style="list-style-type: none"> - Osteoporose - Raquitismo 	<ul style="list-style-type: none"> - Afecta a absorção de zinco, magnésio e ferro
Magnésio	<ul style="list-style-type: none"> - Co-factor em mais de 300 reacções metabólicas - Funções antioxidantes indirectas. - Controlo na produção de moléculas pró-oxidantes e antioxidantes 	<ul style="list-style-type: none"> - Alterações musculares - Anorexia - Náuseas e vómitos 	<ul style="list-style-type: none"> - Braquicardia - Vasodilatação
Potássio	<ul style="list-style-type: none"> - Electrólito intracelular mais abundante - Limita a produção de radicais superóxidos 	<ul style="list-style-type: none"> - Distúrbio das membranas celulares - Fraqueza muscular. 	<ul style="list-style-type: none"> - Náuseas e vómitos - Diarreia - Alterações respiratórias - Falência cardíaca
Sódio	<ul style="list-style-type: none"> - Um dos iões mais importantes do meio extracelular - Mantém equilíbrio aquoso e ácido/base do organismo 	<ul style="list-style-type: none"> - Desregula batimentos cardíacos - Problemas com contracções musculares 	<ul style="list-style-type: none"> - Edemas - Hipertensão arterial

A ingestão excessiva, ou recorrente, de alimentos contendo esses elementos aumentam a quantidade de metais no organismo, que levam ao aparecimento de vários problemas de saúde, desde cancerígenos, mutagénicos e em alguns casos extremos, morte por contaminação. [31] Consequentemente o “*Committee for Food Additives and Contaminants*” recomenda que alimentos potenciados por metais devem ser monitorizados. [32]

Tabela 1.3 - Principais características associadas à ingestão de alguns micronutrientes e nutrientes vestigiários analisados. [30,34,44-48]

	Função Biológica	Deficiência/Patologia	Toxicidade
Crómio	- Controlo da Glucose - Potenciador de acção da insulina	- Intolerância à glucose - Diabetes - Doença Cardíaca	- Disfunção renal - Cancro Pulmunar - Dermatite
Cobalto	- Componente da vitamina B-12	- Complicações neurológicas	- Interferência com a absorção de ferro
Manganês	- Função antioxidante - Regulador de açúcares no sangue - Construtor da estrutura óssea	- Anomalias esqueléticas	- Pancreatite e desordens neurológicas (<i>Parkinson</i> e <i>Esquizofrenia</i>)
Cobre	- Síntese de hemoglobina - Cofactor de várias enzimas - Síntese de colagénio - Produção de proteínas	- Anemia - Aneurisma - Necrose hepática - Coma - Colapso Vascular - Doença de <i>Menkes</i>	- Doença de <i>Wilson</i> - Cancro - Doença cardiovascular - Osteoporose

1.7 - Legislação

Não existe legislação específica para o controlo de metais em chás e muito menos em bebidas contendo algas. Assim, neste projecto foi usada a legislação existente para águas de consumo, o Decreto-Lei 306/2007 de 27 de Agosto.

Na Tabela 1.4 encontram-se os valores paramétricos referentes aos vários elementos analisados.

Tabela 1.4 - Valores paramétricos de alguns elementos constantes no Decreto-Lei 306/2007 de 27 de Agosto, referente a água destinada ao consumo humano. [49]

	Constituinte	Valor paramétrico
Macronutrientes	Cálcio	100 ppm
	Sódio	200 ppm
	Magnésio	50 ppm
Micronutrientes e Vestigiários	Manganês	50 ppb
	Crómio	50 ppb
	Cobalto	50 ppb
	Chumbo	25 ppb*
	Níquel	20 ppb
	Cádmio	5 ppb
	Cobre	2 ppm

*Até 10 de Dezembro de 2013 e 10 ppb após esta data.

O potássio não é mencionado na legislação, daí não constar da tabela Tabela 1.4.

1.8 - Análise de metais por Espectrofotometria de absorção atômica

A espectrofotometria de absorção atômica é a técnica mais usada na determinação de metais nas mais diversas amostras. Esta técnica é baseada no princípio em que os átomos livres gerados num atomizador, são capazes de absorver radiação electromagnética de frequência específica, sendo a intensidade de radiação absorvida directamente relacionada com a quantidade do elemento em estudo, através da lei de Bouger-Lambert-Beer. [50]

A radiação específica é vulgarmente obtida por lâmpadas de cátodo oco revestido com o elemento a determinar, que emitem a radiação descontínua (LS-AAS, *Linear source- Atomic Absorption Spectrometer*), o que implica que apenas linhas do próprio elemento são emitidas pela fonte. A utilização de fontes de emissão contínuas tem sido um grande desafio desde as primeiras experiências realizadas no século XIX com base na absorção atômica da radiação. Mas a ideia foi posta de lado quando Alan Walsh que estas fontes exigiam monocromadores com uma resolução (cerca de 2 pm) muito superiores aos existentes na altura. [51] Na década de 1990 as dificuldades associadas à utilização de fonte contínua, foram ultrapassadas, tendo sido comercializado em 2004 o primeiro modelo de um espectrofotómetro de absorção atômica (CS-AAS) com uma fonte de emissão contínua de xénon. [50] O esquema de um equipamento de CS-AAS pode ser observada na Figura 1.2

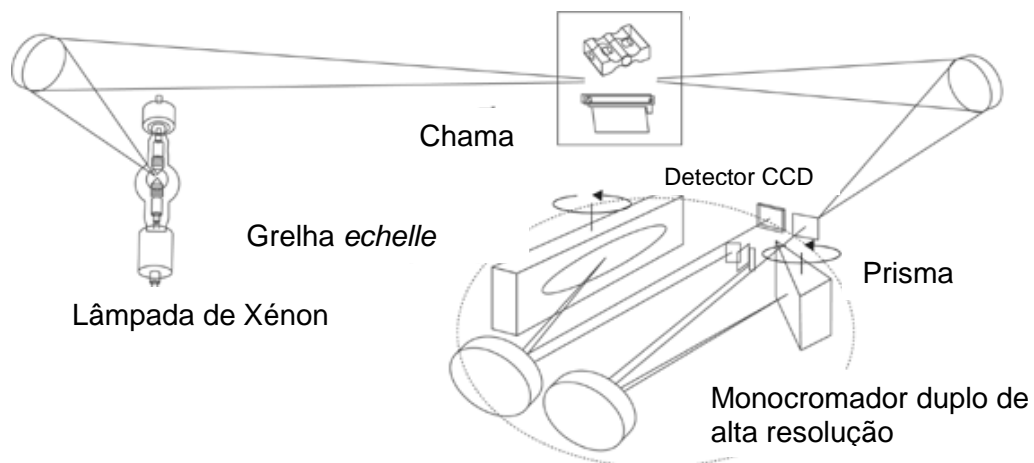


Figura 1.2 – Esquema de espectrofotômetro de absorção atômica de fonte contínua. [52]

Este equipamento possui uma lâmpada de arco curto de xénon de elevada pressão, cerca de 15 bar quando fria. É operada a uma potência de 300 W e é constituída por dois eléctrodos de tungsténio com uma distância de 1 mm entre eles. Com esta configuração é possível ter uma intensidade de emissão 1 a 3 vezes superior às lâmpadas de cátodo oco. Esta lâmpada opera com um *hot-spot* cuja emissão compreende uma faixa contínua entre 190 e 850 nm. Apesar dos arcos serem instáveis, o equipamento possui um sistema controlado automático que move os espelhos, garantindo que o feixe de radiação esteja constantemente alinhado com o centro do atomizador e conseqüentemente com a fenda de entrada do monocromador. [50]

A radiação incidente, após passar pela amostra atomizada, é dirigida para o monocromador duplo de alta resolução (DEMON, *Double-echelle monochromator*), incidindo primeiro num prisma com um arranjo *Littrow* e numa rede de difracção *echelle*. O prisma desempenha um papel pré-dispersor, escolhendo a secção do espectro de interesse, enquanto o monocromador *echelle* fornece a alta resolução inferior a 2 pm por pixel (unidade fotossensível do detector) num intervalo espectral de 0,4 nm. O equipamento possui também um sistema de verificação e ajuste activo de comprimentos de onda, através de uma lâmpada de Néon. [50]

Por fim, a radiação emitida é transmitida, atingindo o detector. Este é constituído por um arranjo linear de dispositivos de carga acoplada (CCD). Em pixel terá um amplificador próprio. O equipamento opera com 512 pixeis independentes entre si, em que 200 são efectivamente usados para a detecção analítica. Desta forma é obtida uma série de informações não disponíveis em instrumentos convencionais. Torna-se assim possível avaliar o sinal medido em três dimensões,

ou seja, há três maneiras diferentes de visualizar a informação obtida pelo HR-CS-AAS: (i) o habitual sinal transiente (absorvância vs. tempo), (ii) o sinal de absorvância integrada vs. comprimento de onda, que permite visualizar qualquer absorção de radiação que tenha ocorrido no intervalo espectral em análise e (iii) a imagem tridimensional, que mostra a absorvância como função do tempo e do comprimento de onda. [50] Todos estes modos de visualização são ilustrados na Figura 1.3, que representa o resultado da análise de uma amostra contendo cobre.

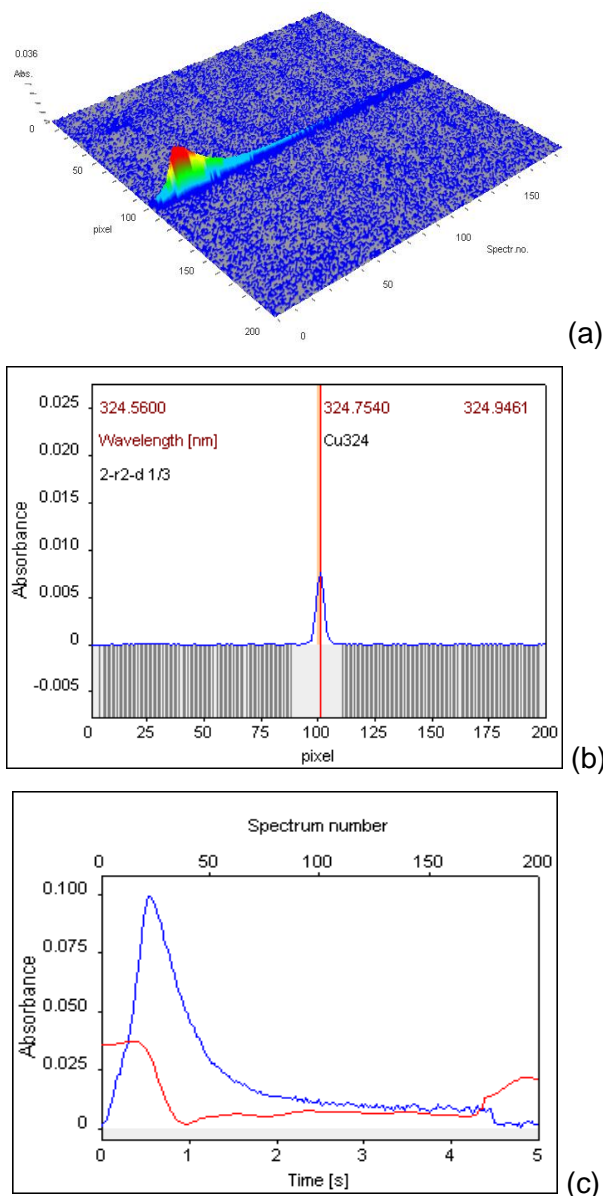


Figura 1.3 - Análise de cobre numa amostra por atomização electotérmica no espectrofotómetro de absorção atómica de fonte contínua (GF-CS-AAS):

(a) espectro tridimensional da absorvância em função do comprimento de onda (expresso em pixel) e do tempo.

(b) espectro da absorvância entre 324,5600 – 324,9461 nm.

(c) aborvâncias integradas aos pixéis 101±3 em função do tempo de análise (número de espectro).

O espectro 3D permite observar eventuais interferências da matriz da amostra a analisar, tal como se pode evidenciar na Figura 1.4, que revela a interferência de uma banda molecular.

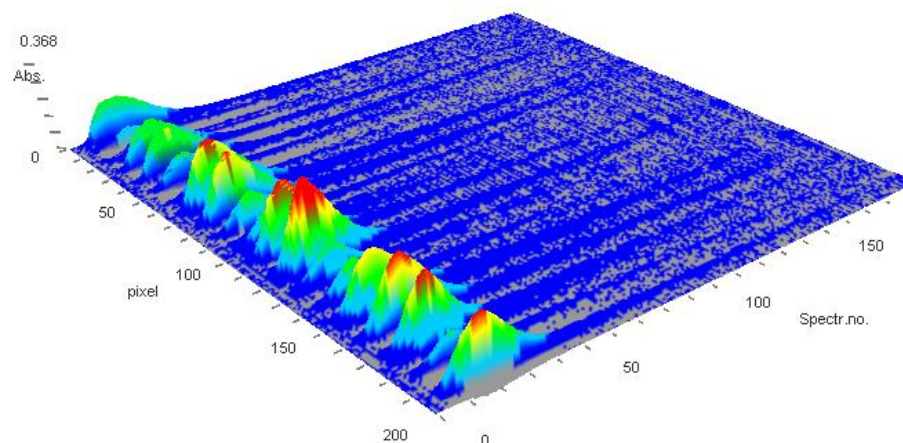


Figura 1.4 – Banda molecular no espectro tridimensional obtido na análise de Pb numa amostra de chá.

Uma das características mais importantes do software é a capacidade de corrigir automaticamente eventos contínuos, ou seja, eventos que afectam de maneira semelhante todos os pixéis do detector. Por outro lado a ausência de componentes ópticos adicionais faz com que a condutância óptica seja consideravelmente superior à obtida por LS-AAS. Obviamente o sistema descrito anteriormente apenas pode corrigir o tipo de absorção que não muda sistematicamente no intervalo espectral observado, de modo que a absorção de radiação proveniente de outros átomos ou moléculas que possuam estrutura rotacional fina sobreposta ao espectro de excitação electrónica permanece visível. De qualquer forma a alta resolução do monocromador permite identificar o aparecimento destas estruturas específicas e eliminá-las com um procedimento adequado de correcção. [50]

As principais diferenças instrumentais entre um LS-AAS e um CS-AAS, bem como algumas das características já mencionadas anteriormente, podem ser resumidas na Tabela 1.5.

Tabela 1.5 - Diferenças instrumentais entre LS-AAS e CS-AAS. [50-51, 53-54]

Característica	LS-AAS	CS-AAS
Fonte de radiação	<ul style="list-style-type: none"> - Descontínua- só emite a radiação dos comprimentos de onda do elemento a analisar - São necessárias tantas lâmpadas quantos os elementos a analisar - Requer estabilização prévia de cada fonte de radiação de cerca de 15 a 20 minutos para a análise 	<ul style="list-style-type: none"> - Contínua- Lâmpada de xénon de arco curto de alta intensidade que emite a radiação de todos os comprimentos de onda (190 a 850 nm) - Lâmpada única para todos os elementos a analisar - Não requer estabilização prévia da fonte de radiação
Monocromador	<ul style="list-style-type: none"> - Rede de difracção <i>Echellet</i> (Resolução de 1800 linhas/mm) - Fenda variável: 0,2; 0,5; 0,8 e 1,2 nm 	<ul style="list-style-type: none"> - Rede de difracção Echelle acoplado com prisma - Fenda/ Intervalo espectral: 2×10^{-3} nm
Detector	<ul style="list-style-type: none"> - Fotomultiplicador 	<ul style="list-style-type: none"> - Dispositivo de carga acoplado (CCD) <p>No que se refere ao fotomultiplicador:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Elevada eficiência quântica desde o UV longínquo até ao IV próximo - Maior razão sinal/ruído - Acentuada redução na capacidade de saturação <p>Estas características permitem:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Melhor sensibilidade - Menores limites de detecção numa gama de trabalho mais alta
Correcção de fundo	<ul style="list-style-type: none"> - Lâmpada de deutério (curto tempo de vida) - Efeito <i>Zeeman</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - Correcção simultânea de ruído de fundo sem perda de tempo real de análise e sensibilidade: <p>Recorre a algoritmos inovadores de correcção que compensam qualquer variação do sinal incluindo da fonte de radiação</p>
Aplicação	<ul style="list-style-type: none"> - Analisa um certo número de elementos sob a forma atómica, desde que a lâmpada seja comercializada 	<ul style="list-style-type: none"> - Analisa qualquer elemento sob a forma atómica incluindo elementos para os quais não existe lâmpada de cátodo oco - Analisa compostos não metálicos como enxofre ou fósforo

Pode-se assim referir que a alta resolução e o uso de uma única fonte de radiação fazem do HR-CS-AAS uma excelente ferramenta para desenvolvimento de métodos analíticos e facilita as análises de rotina.

1.9 - Validação do método de análise

Todos os métodos de análise instrumental quantitativa requerem a determinação de uma curva de calibração, em que se estuda uma relação entre o sinal medido em soluções padrão e as suas concentrações. Para um analista a melhor curva de calibração é aquela que permite determinar o valor mais próximo, entre o valor determinado e o valor teórico, dentro de uma gama de concentrações pré-definidas, sendo por isso calculada por métodos estatísticos de regressão.

Idealmente uma curva de calibração deve ser uma relação linear, para minimização de erros nos pontos experimentais. Verifica-se frequentemente que

nem todos os pontos experimentais apresentam os mesmos desvios, em particular no caso dos pontos de concentração mais baixa ou mais alta. Nestes casos um método de regressão linear ponderada com os valores dos respectivos desvios padrão pode dar um ajuste mais adequado. Por norma, o coeficiente de correlação (R) ou o coeficiente de determinação (R^2), são os critérios mais usuais de avaliação da concordância entre os valores experimentais e a equação obtida, em que, dependendo da técnica analítica, um valor de 0,995 ou 0,99 pode ser considerado aceitável, para a técnica em questão.

Para uma correcta selecção do método de regressão que traduza a curva de calibração do método analítico deve ser aplicado um teste de linearidade (baseado em diferença de variâncias) e devem ser avaliados os resíduos do método, isto é, a diferença entre o valor experimental e o valor teórico dado pela equação da recta. A equação que melhor representa os pontos experimentais será a que apresentar resíduos mais próximos de zero. Para avaliar este parâmetro calcula-se o somatório do quadrado dos resíduos (SS_{res}). [55-58]

O método de regressão linear dos mínimos quadrados é forma mais habitual para a determinação das curvas de calibração. Contudo, quando os critérios de avaliação da linearidade não dão uma resposta aceitável, terá que se aplicar um método de regressão não linear, sendo o mais usual o da regressão quadrática.

1.10 - Objectivo do estudo

O objectivo deste estudo consistiu no desenvolvimento de métodos analíticos para avaliar o teor de metais essenciais (macro, micro e nutrientes vestigiários) e de metais pesados em infusões de chás e ervas aromáticas, contendo ou não algas. A espectrofotometria de absorção atómica é a técnica analítica de referência para a análise de metais. Neste trabalho foi utilizado um espectrofotómetro com uma tecnologia inovadora que utiliza uma fonte contínua para as análises dos diversos elementos, tendo sido utilizada a atomização por chama (Ca, K, Mg, Mn, Na) ou electrotérmica (Cu, Co, Cd, Cr, Ni, Pb), de acordo com os níveis de metais encontrados nos chás.

Este trabalho deu origem a três comunicações sobre a forma de posters:

1 – Seguro, I, Pinto, JC, Mansilha, C, Delerue-Matos, C, Oliva-Teles, MT, Gameiro, P, 2009. Analysis of Metals in Natural Waters By High-Resolution

Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry. Euroanalysis. Innsbruck, Austria, 6 a 10 Setembro, Poster P077-b1.

2 - Pinto, JC, Sousa, SR, Delerue-Matos, C, Oliva-Teles, MT, 2010. Espectrofotometria de Absorção Atómica de alta resolução com fonte contínua em análise vestigiária de metais em chás. I Encontro em Técnicas de Caracterização e Análise Química. Universidade do Minho. Departamento de Química. 7 de Maio.

3 - Pinto, JC, Sousa, SR, Delerue-Matos, C, Oliva-Teles, MT, 2010. Análise de chumbo e cobre em chás por espectrofotometria de absorção atómica de alta resolução com fonte contínua por atomização electrotérmica. VI Congresso Ibérico de Espectroscopia. Universidade do Porto. Faculdade de Farmácia. 8 a 10 de Dezembro.

2 - Parte Experimental

2.1 - Material e Equipamento

Para a preparação de todas as amostras foi utilizada água ultrapura proveniente de um sistema Simplicity 185 da marca Millipore. A resistividade da água ultrapura utilizada foi de 18,2 M Ω .cm.

A digestão das amostras foi efectuada num microondas MarsX 1500W da CEM Corporation (Figura 2.1), utilizando-se vasos de teflon XP 500 de 100 ml, também da CEM corporation, com fecho hermético (0,04 Psi).



Figura 2.1 - Microondas MarsX da CEM Corporation.

A quantificação das soluções foi realizada num espectrofotómetro de absorção atómica ContrAA 700 da Analytik Jena, apresentado na Figura 2.2, equipado com amostradores automáticos da Analytik Jena, o AS 52S para a atomização por chama (F-CS-AAS) e o MPE 60, para atomização electrótermica (GF-CS-AAS). Foram utilizados tubos de grafite pirolíticos com plataforma (Ic Rohr Pin-Platform) da Analytik Jena.



Figura 2.2 – Espectrofotómetro de absorção atômica ContrAA700 da Analytik Jena.

Todo o material utilizado durante este trabalho experimental foi lavado e colocado num banho de ácido nítrico (comercial) e água desionizada, numa proporção 1:1. O material era deixado durante cerca de 24 horas neste banho, sendo posteriormente enxaguado com água ultra-pura e seco em estufa a 50 °C. Desta maneira evitava-se qualquer contaminação que pudesse interferir nos ensaios realizados, devido a adsorção de metais às paredes do material.

2.2 - Reagentes

Foi usado ácido HNO_3 65% (Suprapur) da marca Merck para acidificação das soluções. Na preparação de soluções padrão de absorção atômica usaram-se soluções stock de 1000 ppm da Panreac-AA para o Ca, Mn, Mg, Cd, Co, Cr, Cu, Ni e Pb, da Merck para o Na e para o K da Alfa Aesar-AA.

Dependendo do elemento em estudo foram adicionados modificadores de matriz e ionizadores de chama. Para a atomização por chama usou-se o CsCl p.a. da marca Riedel-de Haën e o $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ p.a. da marca Panreac-AA ; em atomização electrotérmica usou-se o $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, o $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ da Merck eo $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ da Panreac-AA. Na atomização por chama utilizou-se uma mistura de Ar/Acetileno como gases de combustão para a queima. Foi ainda utilizado o Árgon como gás de purga para eliminação de interferências ambientais na atomização electrotérmica,

alimentado a uma pressão aproximada de 6,0 bar. Os gases utilizados foram fornecidos pela Linde Sogás.

2.3 - Preparação de soluções padrão

Todas as soluções preparadas (concentração intermédia ou final) foram acidificadas com HNO₃ a 0,5 ou 1 %. Foram preparadas soluções-mãe dos modificadores e dos ionizadores com concentração de 40 % (m/v).

Para a determinação por F-CS-AAS dos metais em estudo (Ca, Mn, Mg, Na e K) foram preparadas soluções padrão aquosas, por diluição adequada com água-ultrapura, a partir dos padrões 1000 ppm ou a partir de um padrão de concentração intermédia (10 ppm). A todas as soluções padrão foi adicionado o modificador, de acordo com especificações do equipamento. Na Tabela 2.1 apresentam-se as gamas de trabalho (concentrações) de cada elemento estudado, e as concentrações de HNO₃ e de modificador para as análises por F-CS-AAS. [59]

Tabela 2.1 - Preparação de soluções padrão para análises por F-CS-AAS.

Elemento	Intervalo de Concentrações (ppm)	HNO ₃ (%)	Modificadores (%)	
			CsCl	La(NO ₃) ₃
Ca	0,10 - 5,0	1	-	1
Na	0,04 - 1,6	1	0,1	-
Mn	0,10 - 1,5	1	0,1	-
Mg	0,04 - 1,0	1	0,1	-
K	0,08 - 2,0	1	0,1	-

Nas análises por GF-CS-AAS era preparada diariamente apenas a solução padrão de concentração superior da gama de trabalho, a partir de uma solução de concentração intermédia (1 ppm), acidificada a 0,5 %. Esta era obtida por diluição e acidificação da solução mãe de 1000 ppm. As restantes soluções padrão eram preparadas no pipetador do amostrador automático. Utilizavam-se volumes variáveis de solução padrão e de solução de diluição (solução acidificada a 0,5 %) de modo a completar um volume final de 20 µL. Por fim adicionaram-se 5 µL do modificador. Na Tabela 2.2 apresentam-se a gama de trabalho de cada elemento analisado por GF-CS-AAS (Cd, Co, Cr, Cu, Ni e Pb) e as concentrações de HNO₃ e de modificador em cada solução padrão.

Tabela 2.2 - Preparação de soluções padrão para GF-CS-AAS.

Elemento	Intervalo de Concentrações (ppb)	HNO ₃ (%)	Modificador (%)		
			Pd(NO ₃) ₂	Mg(NO ₃) ₂	NH ₄ H ₂ PO ₄
Cd	0,5 - 5,0	0,5	-	-	1
Co	0,5 - 10,0	0,5	-	0,05	-
Cr	1,0 - 20,0	0,5	-	0,1	-
Cu	2,0 - 20,0	0,5	0,1	0,05	-
Ni	3,0 - 30,0	0,5	-	0,05	-
Pb	7,5 - 30,0	0,5	-	-	1

2.4 - Preparação das amostras

As amostras estudadas eram infusões de chás e de ervas aromáticas preparadas a partir de saquetas, adquiridas em superfícies comerciais na zona do Porto, durante o ano de 2009. A composição indicada no rótulo de cada amostra em estudo é apresentada na Tabela 2.3.

Tabela 2.3 - Caracterização das amostras.

Amostra	Composição
1	- Camomila
2	- Folhas de chá verde (95 %) - Aroma de Canela
3	- Folhas chá verde (70 %) - Ervas de limão (20 %) - Algas (10 %)
4	- Chá Preto (100 %)
5	- Lima
6	- Chá (53,8 %) - Rooibos Sul Africano (35,8 %) - Hibiscos - Baunilla - Especiarias
7	- Folhas de Sene (25 %) - Raiz de Gilbarbeira (25 %) - Algas Marinhas (25 %) - Folha de Ginkgo Biloba (25 %)
8	- Dextrose - Extracto de Chá verde (3 %) - Fibra de Chicória - Extracto de Malvas - Extracto de Algas (0,2 %)
9	- Sene (30 %) - Planta de Chicória (15 %) - Planta Cavalinha (15 %) - Planta Alfaca (10 %) - Algas Marinhas (10 %) - Casca de Amieiro (10 %) - Flor de Sabugueiro (10 %)

Para a análise das amostras em estudo extraíram-se os elementos por imersão da saqueta amostra em cerca de 200 mL de água ultrapura aquecida até à ebulição (gobelé) durante 5,0 minutos. Posteriormente deixava-se arrefecer a solução à temperatura ambiente. No final a solução era transferida para um balão volumétrico de 200 mL e acidificada a 1 % de HNO₃. As soluções amostras eram congeladas de forma a evitar contaminações ou alterações na sua composição durante o seu armazenamento até serem analisadas.

Para as amostras 2, 4, 8 e 9 foram preparadas 3 réplicas de cada um destes chás, ou seja, 3 saquetas preparadas independentemente de cada uma destas amostras, sendo efectuada a digestão de 10 mL de amostra e posterior análise. As restantes amostras foram analisadas sem réplicas e sem digestão.

Para a digestão ácida em forno de microondas, pipetou-se 10,00 mL de infusão e adicionou-se 5 mL de HNO₃ 65%. Os vasos de digestão eram então devidamente fechados e colocados no microondas seguindo o programa de temperaturas previamente utilizado [60] e apresentado na Tabela 2.4. Depois de arrefecida a solução foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL, perfazendo-se o volume com água ultra-pura.

Tabela 2.4 - Programa de digestão otimizado para as amostras. [60]

	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Potencia Máxima (W)	Pressão Máxima Admitida (Psi)
Estágio 1	0 - 5	35 – 50	300	150
	5 - 15	50	300	150
Estágio 2	15 - 25	50 – 100	420	200
	25 - 35	100	420	200
Estágio 3	35 - 45	100 – 150	540	200
	45 - 60	150	540	200

2.5 - Procedimento experimental

Em todas as análises por CS-AAS fez-se a optimização dos parâmetros instrumentais do elemento em estudo, seguido do traçado da curva de calibração e análise das amostras.

Os parâmetros optimizados para as análises com atomização por chama (proporção de gases e altura de queimador) e a linha principal do elemento usado em cada método de análise podem ser observados na Tabela 2.5.

Tabela 2.5 - Parâmetros instrumentais utilizados na análise por F-CS-AAS cada elemento.

Elemento	Linha espectral (nm)	Caudal C ₂ H ₂ -Ar (L/h)	Altura do Queimador (mm)
Ca	422,6728	50	8
Na	588,9993	40	5
Mn	279,4817	50	6
Mg	285,2125	50	8
K	766,4908	45	6

Para a quantificação de todos os elementos por GF-CS-AAS foi efectuada uma secagem prévia com 3 passos: (i) 80 °C (6 °C/s; 20 s); (ii) 90 °C (3 °C/s; 20 s) e (iii) 110 °C. As temperaturas de Pirólise e de Atomização para cada elemento foram previamente optimizadas. Na Tabela 2.6 apresentam-se as referidas temperaturas e a linha espectral para cada elemento.

Tabela 2.6 - Parâmetros de optimização do programa de temperaturas, tempos e modificadores usados para cada elemento GF-CS-AAS.

Elemento	Linha Espectral (nm)	Pirólise			Atomização		
		T (°C)	v (°C/s)	t (s)	T (°C)	v (°C/s)	t (s)
Cd	228,8018	900	300	5	1400	1500	3
Co	240,7524	1300	300	5	2300	1500	5
Cr	359,3488	1200	300	5	2200	1500	4
Cu	324,7540	1200	300	5	1900	1500	4
Ni	232,0030	1100	300	5	2250	1500	4
Pb	283,3060	800	300	5	1500	1500	4

A absorvância registada correspondeu ao somatório da integração da intensidade dos sinais obtidos durante os 3 s de quantificação dos 3 pixéis (o pixel principal 101 correspondente ao comprimento de onda da linha principal e os pixéis 100±1).

O tubo de grafite era limpo antes de cada ensaio segundo um programa de aquecimento específico, com temperatura máxima de aquecimento de 2000 a 2500 °C, dependendo do elemento em análise.

2.6 - Validação do método

2.6.1 - Regressão Linear

Por regressão linear foram determinados os parâmetros da recta $y=a+bx$ [55] bem como o coeficiente de determinação desta mesma recta. Foram também avaliados os erros da regressão pelo cálculo dos desvios padrão da regressão (S_y), do declive (S_b), da ordenada na origem (S_a) e do erro do método (S_{x_0}). [56-57] Estes podem ser calculados segundo as seguintes equações (1-3):

$$S_y = \sqrt{\frac{\sum(y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \quad (2.1)$$

$$S_b = \frac{S_y}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2}} \quad (2.2)$$

$$S_a = S_y \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n \sum(x_i - \bar{x})^2}} \quad (2.3)$$

O S_y estima os erros aleatórios no eixo dos yy' , calculando-se a partir do seu valor o desvio padrão tanto para a intercepção da recta com o eixo dos yy' (a) e o seu declive (b). Com os valores de S_a e S_b foi possível determinar os limites de confiança tanto para a origem como o declive da recta segundo um teste de F-Fisher (Teste-F) [56]. Estes valores foram calculados segundo um grau de confiança de 95% com $n-2$ graus de confiança.

Calculou-se também o S_{x_0} que representa o erro associado à determinação das concentrações segundo o ajuste linear efectuado, através da seguinte expressão:

$$S_{x_0} = \frac{S_y}{b} \quad (2.4)$$

Com o valor de S_{x_0} foi possível calcular a percentagem do coeficiente de variação do método (V_{x_0}):

$$V_{x_0} = \frac{S_{x_0}}{\bar{x}} * 100 \quad (2.5)$$

Foi ainda realizado o teste de linearidade, de forma a avaliar se resultados encontrados seguiam um comportamento linear ou não linear, como suporte ao método gráfico. Desta maneira era calculado o DS^2 [56]:

$$DS^2 = (N - 2)S_{y1}^2 - (N - 3)S_{y2}^2 \quad (2.6)$$

Em que o S_{y1} refere-se ao S_y calculado segundo ajuste por regressão linear e o S_{y2} refere-se ao S_y calculado por regressão quadrática. Determinou-se então o valor de teste PG (equação 6) que posteriormente era comparado com o valor tabelado para um teste-F (teste de F-Fischer) para avaliar se a diferença de variâncias obtida era, ou não significativa: quando o valor de PG [56] fosse inferior ao valor F equação era linear.

$$PG = \frac{DS^2}{S_{y2}^2} \quad (2.7)$$

Avaliou-se também o SS_{res} , isto é, o somatório do quadrado das diferenças entre os valores de absorvância encontrados experimentalmente e os valores de absorvância calculados segundo a recta de calibração. Quanto mais próximo de zero fosse o somatório do quadrado destas diferenças mais adequado era o ajuste encontrado.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados com base no valor de S_y através das seguintes expressões [55]:

$$LD = \frac{3 \cdot S_y}{b} \quad (2.8)$$

$$LQ = \frac{10 \cdot S_y}{b} \quad (2.9)$$

2.6.2 - Regressão Linear Ponderado

Em todas as curvas de calibração traçadas foi também estudado o ajuste por regressão linear ponderada. [58] Enquanto no método de regressão linear é considerado que os erros referentes ao eixo dos yy' são iguais para todos os pontos, neste método (linear ponderado) é considerado que os erros são proporcionais à concentração do analito. Como tal é considerado que o erro relativamente ao eixo

dos yy' será tanto maior quanto maior for o valor de x correspondente. Desta maneira os cálculos são efectuados dando a um maior relevo aos pontos em que o erro é menor.

Neste tratamento calculou-se o peso ponderado de cada ponto experimental. Assim, para cada valor de concentração (x):

$$w_i = \frac{s_i^{-2}}{\sum s_i^{-2} / n} \quad (2.10)$$

em que s_i corresponde ao desvio padrão de cada y_i medido. Desta maneira calcula-se o declive ponderado (b_w), bem como a intercepção com a origem ponderada (a_w):

$$b_w = \frac{\sum w_i x_i y_i - n \bar{x}_w \bar{y}_w}{\sum w_i \bar{x}_i^2} \quad (2.11)$$

$$a_w = \bar{y}_w - b \bar{x}_w \quad (2.12)$$

O valor do coeficiente de correlação foi calculado de forma idêntica ao da regressão linear, mas usando os valores de x e y ponderados.

Tal como no ajuste linear foram também calculados os valores de S_y e S_{x0} :

$$S_{(y)_w} = \left(\frac{\sum w_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2} \right)^{1/2} \quad (2.13)$$

$$S_{x0_w} = \frac{S_{(y)_w}}{b} \left(\frac{1}{w_0} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y}_w)^2}{\sum w_i \bar{x}_i^2 - n \bar{x}_w^2} \right)^{1/2} \quad (2.14)$$

Com a equação 2.14 foi possível calcular o coeficiente de variação do método expresso em percentagem:

$$V_{x0} = \frac{S_{x0_w}}{\bar{x}} * 100 \quad (2.15)$$

Foi também realizado o teste de linearidade com os valores ponderados usando as expressões do ajuste linear ponderado.

Os LD e LQ foram também calculados com base nos valores de S_{yw} e b_w .

$$LD = \frac{3 * S(y)_w}{b_w} \quad (2.16)$$

$$LQ = \frac{10 * S(y)_w}{b_w} \quad (2.17)$$

2.6.3 - Regressão Quadrática

O ajuste quadrático (ax^2+bx+c) dos pontos experimentais obtidos para o traçado da curva de calibração foi também estudado. Os parâmetro a, b e c foram determinados por um processo iterativo utilizando o programa Solver do Microsoft Excel [61] e baseado no cálculo do valor mínimo do SS_{res} com base nos valores experimentais. O coeficiente de correlação por sua vez, foi calculado segundo: [57]

$$R^2 = 1 - \frac{\sum(y - \hat{y})^2}{\frac{\sum y^2 - (\sum y)^2}{n}} \quad (2.18)$$

Foram também calculados os LD e LQ tendo por base o valor dos parâmetros de ajuste b e c, bem como o S_y [57]:

$$S_y = \sqrt{\frac{\sum(y_i - \hat{y}_i)^2}{n-3}} \quad (2.19)$$

$$S_{x0} = \frac{S_y}{b + 2a\bar{x}} \quad (2.20)$$

$$V_{x0} = \frac{S_{x0}}{\bar{x}} * 100 \quad (2.21)$$

$$LD = \frac{3 * S_y}{b + 2c\bar{x}} \quad (2.22)$$

$$LQ = \frac{10 * S_y}{b + 2c\bar{x}} \quad (2.23)$$

3 - Resultados e Discussão

A quantificação foi realizada pelo método da curva de calibração. As equações da calibração foram seleccionadas após o estudo do ajuste por regressão linear ($y=a+bx$), linear ponderada ($y=a_w+b_w x$) e a quadrática ($y=ax^2+bx+c$). Na escolha da melhor curva consideraram-se os valores dos coeficientes de correlação (R), dos resíduos (SS_{res}) e o teste de linearidade, com um grau de significância de 95 %. [55-57]

Para a caracterização do método foram também calculados os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ).

3.1 - Análises dos metais por atomização em chama

Os elementos Ca, Mn e Mg, Na e K foram determinados por F-CS-AAS, com base numa curva de calibração.

3.1.1 - Cálcio

A curva de calibração do Ca é apresentada na Figura 3.1. Os valores do desvio padrão relativo (RSD) das absorvâncias integradas foram inferiores a 2,5 %, excepto para o padrão mais diluído que apresentavam um valor de absorvância baixo (RSD=58 %).

Os parâmetros associados aos cálculos das regressões são apresentados na Tabela 3.1. Podemos observar que o ajuste linear ponderado não foi adequado para este conjunto de dados, uma vez que o coeficiente de determinação obtido apresentava um valor inferior a 0,9 ($R^2=0,8836$).

Os parâmetros de avaliação para as outras duas regressões foram semelhantes, com um R^2 e SS_{res} da mesma ordem de grandeza. Contudo, a regressão linear apresentou um R^2 e um SS_{res} ligeiramente melhores (R^2 de 0,997 > 0,994; SS_{res} 1,99E-04 < 3,25E-04). O teste de linearidade deu positivo, uma vez que o valor de PG (-1,32) foi inferior ao obtido pelo teste-F (16,3) para um grau de significância de 95 %.

Conjugando todos estes factores podemos dizer que o melhor ajuste para este elemento foi o da regressão linear, de equação Absorvância = 0,0077 + 5,40E-02 C em que C corresponde à concentração. Os limites de detecção e de

quantificação determinados apresentaram um valor de 0,32 ppm e 1,0 ppm, respectivamente.

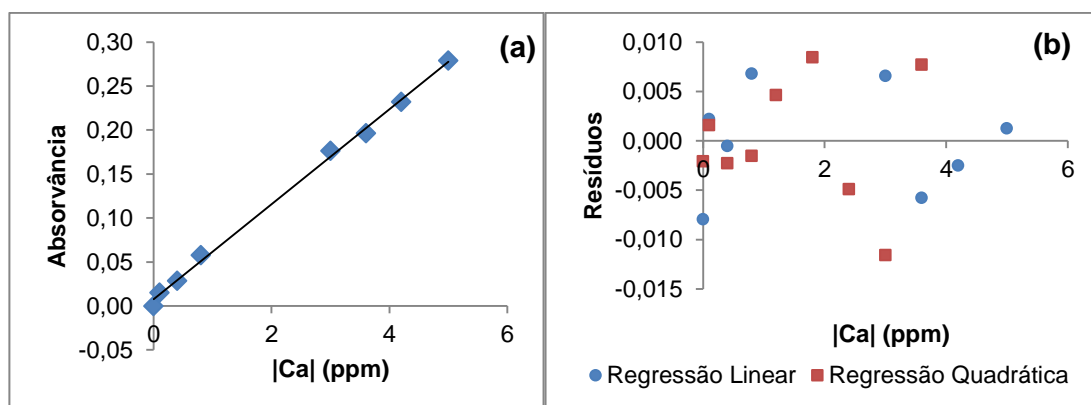


Figura 3.1 – (a) Curva de calibração para o Ca e (b) gráfico dos resíduos.

Tabela 3.1 - Parâmetros experimentais para avaliação do método de regressão para traçado da curva calibração do Ca.

	Regressão		
	Linear	Linear Ponderada	Quadrática
a	0,0076	0,0041	- 3,17E-03
b	5,40E-02	5,82E-02	7,43E-02
c	-	-	0,0018
R ²	0,9976	0,8836	0,9941
S _y	5,8E-03	4,2E-03	7,4E-03
S _{x0}	1,1E-01	7,12E-02	1,2E-01
V _{x0} (%)	4,4	3,0	5,5
SS _{res}	1,9E-04	1,0E-03	3,2E-04
DS ²	- 7,2E-05	- 1,7E-04	-
PG	-1,32	-3,09	-
F	16,3	16,3	-
LD (ppm)	0,32	0,21	0,27
LQ (ppm)	1,07	0,71	0,92

3.1.2 - Potássio

A curva de calibração do K é apresentada na Figura 3.2. O desvio padrão relativo máximo das absorvâncias integradas foi de 3,75 %. A partir dos dados experimentais foram calculados os parâmetros para as diferentes regressões e são apresentados na Tabela 3.2. O melhor valor do coeficiente de determinação, foi obtido para o ajuste quadrático (0,9999). O valor mais baixo do SS_{res} também foi obtido para a regressão quadrática, com um valor de 2,9E-05. De salientar que

também o teste de linearidade indicou um ajuste não linear, uma vez que os valores de PG, tanto para a regressão linear como para a linear ponderada, foram superiores ao valor do teste-F (com 95 % de significância).

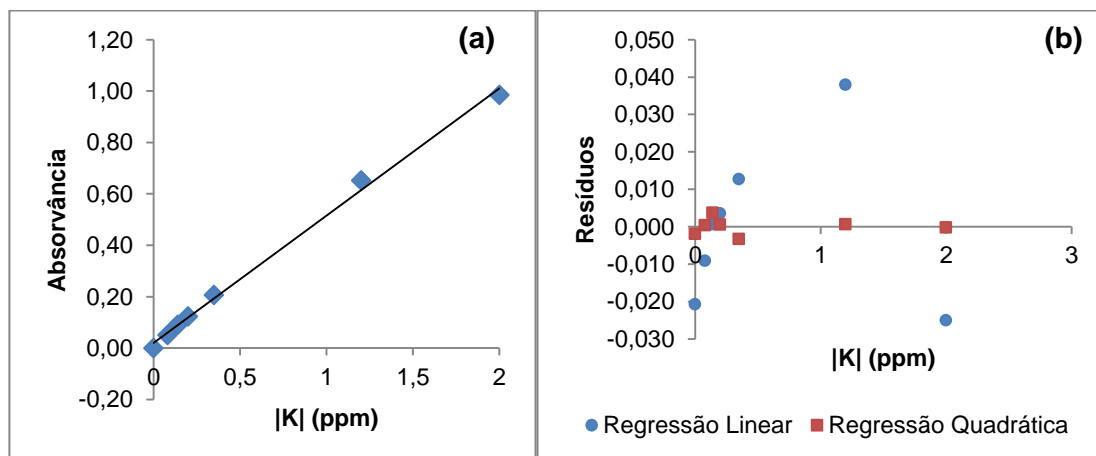


Figura 3.2 - (a) Curva de calibração para o K e (b) gráfico dos resíduos.

Tabela 3.2 - Parâmetros experimentais para avaliação do método de regressão para traçado da curva calibração do K.

	Regressão		
	Linear	Linear Ponderada	Quadrática
a	0,0200	0,0017	-6,22E-02
b	0,495	0,509	0,616
c	-	-	0,0013
R ²	0,9967	0,9778	0,9999
S _y	2,35E-02	2,28E-02	2,73E-03
S _{x0}	4,7E-02	4,5E-02	5,1E-03
V _{x0} (%)	7,2	6,7	0,7
SS _{res}	2,7E-03	1,2E-02	2,9E-05
DS ²	3,3E-03	3,1E-03	-
PG	440	410	-
F	16,3	16,3	-
LD (ppm)	0,14	0,13	0,013
LQ (ppm)	0,47	0,45	0,044

Este tratamento foi realizado com uma gama de absorvâncias alargado, consequentemente, avaliou-se a linearidade para o conjunto de dados experimentais mais apertado (Abs ca. 0 - 0,2). Os parâmetros calculados podem ser observados na Tabela 3.3. Embora o teste de linearidade tenha sido positivo, considerou-se que a regressão quadrática se ajustava melhor aos pontos experimentais, atendendo aos valores de R², V_{x0} e de SS_{res}, tal como considerado por outros autores. [62]

Tabela 3.3 - Parâmetros experimentais para avaliação do método de regressão para traçado da curva calibração do potássio para uma gama de absorvância até 0,2.

	Regressão		
	Linear	Linear Ponderada	Quadrática
a	0,03200	0,03000	-2,17E-01
b	0,588	0,397	0,666
c	-	-	-0,0005
R ²	0,9980	0,9960	0,9998
S _y	4,00E-03	3,22E-02	1,29E-03
S _{x0}	6,8E-03	8,1E-02	2,2E-03
V _{x0} (%)	3,5	28	1,2
SS _{res}	4,8E-05	3,9E-03	5,0E-06
DS ²	3,9E-05	4,1E-03	-
PG	24	2500	-
F	34,1	34,1	-
LD (ppm)	0,020	0,24	0,0058
LQ (ppm)	0,068	0,81	0,019

Para a calibração do K foi utilizada a equação Absorvância = - 6,22E-02 C²+ 6,16E-01 C + 0,00135, em que C é a concentração expressa em ppm. O valor do limite de detecção foi de 0,013 ppm e o do limite de quantificação foi de 0,044 ppm.

3.1.3 - Magnésio

A curva de calibração do Mg é apresentada na Figura 3.3. Obteve-se um desvio padrão relativo máximo de 3,74 % para as absorvâncias medidas, excepto para o padrão de menor concentração que apresentou um valor de 6,18 %.

Os parâmetros para as diferentes regressões são apresentados na Tabela 3.2 Para este elemento o melhor coeficiente de determinação foi encontrado para o ajuste quadrático, com um valor de 0,9993. O valor de SS_{res} foi também melhor para o ajuste quadrático, uma vez que era o que apresentava o valor mais baixo (4,9E-04). O teste de linearidade indicou um ajuste não linear para a regressão linear (o valor de PG era superior ao do teste-F) e PG inferior a F para a regressão linear ponderada. No entanto, para este último tratamento os valores de R² e SS_{res} indicam o pior ajuste. A regressão quadrática foi o método de cálculo seleccionado tendo em conta que os valores de R² e SS_{res}.

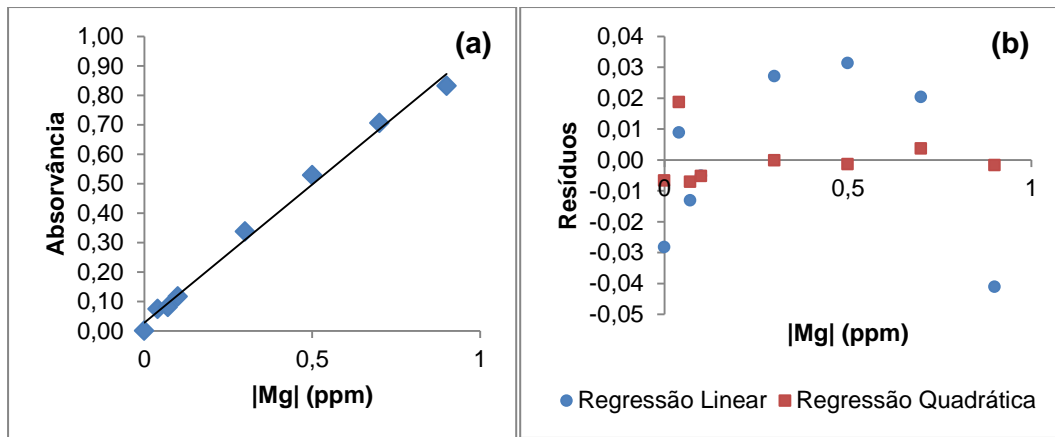


Figura 3.3 - (a) Curva de calibração para o Mg e (b) gráfico dos resíduos.

Tabela 3.4 - Parâmetros experimentais para avaliação do método de regressão para traçado da curva calibração do Mg.

	Regressão		
	Linear	Linear Ponderado	Quadrática
a	0,0280	0,00570	-2,70E-01
b	0,938	1,14	1,18
c	-	-	0,0069
R ²	0,9931	0,9613	0,9993
S _y	2,85E-02	1,37E-02	9,91E-03
S _{x0}	3,0E-02	1,21E-02	1,0E-02
V _{x0}	8,2	3,2	2,7
SS _{res}	4,9E-03	5,0E-02	4,9E-04
DS ²	4,4E-03	6,43E-04	-
PG	44,8	6,55	-
F	16,3	16,3	-
LD (ppm)	0,091	0,060	0,025
LQ (ppm)	0,300	0,120	0,084

Para o Mg também foi realizado um estudo para uma gama de absorvâncias inferiores (a 0,3), de modo a ser possível observar se o ajuste quadrático se mantinha. Com os novos parâmetros calculados (Tabela 3.5) verificou-se que a regressão quadrática e a regressão linear tinham valores de R² e SS_{res} idênticos. O teste da linearidade indica que o ajuste quadrático não é significativo relativamente ao linear (PG < F).

Na quantificação do Mg nas amostras foi utilizada a regressão quadrática porque os ajustes eram idênticos, mas os valores de V_{x0} e os LD e LQ eram menores e com esta regressão evitava-se a diluição das amostras.

Tabela 3.5 - Parâmetros experimentais para avaliação do método de regressão para traçado da curva calibração do Mg para uma gama de absorvância inferior.

	Ajuste a uma Regressão		
	Linear	Linear Ponderado	Quadrática
a	0,011	0,0022	-1,86E-01
b	1,09	1,40	1,15
c	-	-	0,0084
R ²	0,9912	0,9548	0,9928
S _y	1,4E-02	1,4E-02	1,5E-02
S _{x0}	1,3E-02	1,0E-02	1,4E-02
V _{x0} (%)	9,9	8,0	10,9
SS _{res}	5,7E-04	8,2E-03	4,7E-04
DS ²	-6,0E-04	-5,7E-04	-
PG	-25,6	-24,3	-
F	98,5	98,5	-
LD (ppm)	0,038	0,030	0,040
LQ (ppm)	0,13	0,10	0,13

Para o traçado da curva de calibração usou-se a equação Absorvância = $-2,70E-01C^2 + 1,18 C + 0,0069$, em que C é a concentração expressa em ppm. O limite de detecção obtido foi de 0,025 ppm e o limite de quantificação apresentava o valor de 0,084 ppm.

3.1.4 - Manganês

A curva de calibração do Mn é apresentada na Figura 3.4. O desvio padrão relativo máximo das absorvâncias integradas foi de 3,3 %, excepto nas medições do padrão de concentração mais baixa em que foi obtido um RSD de 6,2 %.

Na Tabela 3.6 apresentam-se os parâmetros calculados pelas diferentes regressões para os pontos experimentais. Observou-se que os valores obtidos dos coeficientes de determinação das três regressões estudadas foram idênticos (0,998), contudo o resultado de SS_{res} foi bastante desfavorável para o ajuste linear ponderado. A regressão quadrática foi o ajuste considerado adequado porque apresenta um valor de R² mais elevado e uma ligeira diminuição do valor de SS_{res}.

Para o traçado da curva de calibração usou-se a equação Absorvância = $-2,96E-03 C^2 + 1,43E-01 C + 0,0012$, em que C é a concentração expressa em ppm. Os limites encontrados, foram de LD 0,078 ppm e LQ 0,26 ppm.

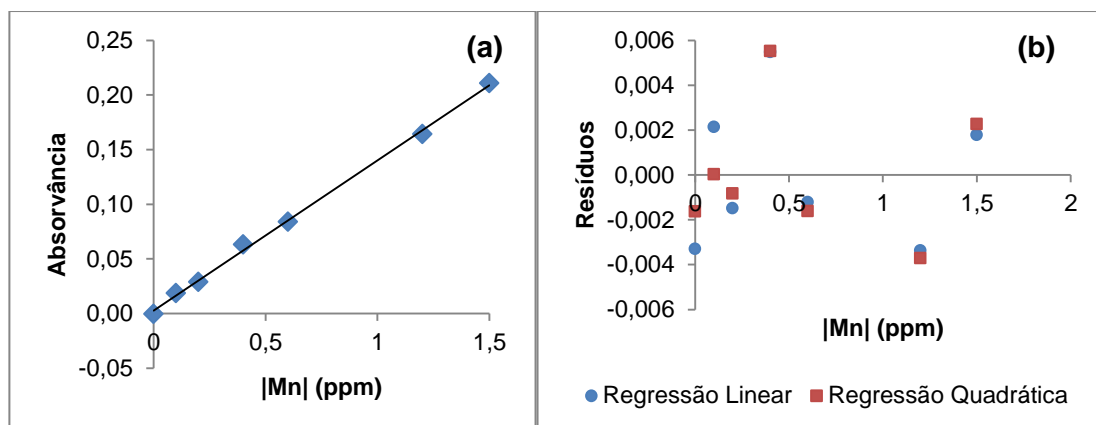


Figura 3.4 - (a) Curva de calibração para o Mn e (b) gráfico dos resíduos.

Tabela 3.6 - Parâmetros experimentais para avaliação do método de regressão para traçado da curva calibração do Mn.

	Ajuste a uma Regressão		
	Linear	Linear Ponderada	Quadrática
a	0,0028	0,0001	-2,96E-03
b	0,137	0,156	0,143
c	-	-	0,0012
R ²	0,9983	0,9989	0,9985
S _y	3,8E-03	1,6E-03	3,7E-03
S _{x0}	2,6E-02	1,0E-02	2,7E-02
V _{x0} (%)	3,9	1,5	4,0
SS _{res}	6,4E-05	1,2E-03	5,5E-05
DS ²	7,1E-06	-5,4E-05	-
PG	0,510	-3,89	-
F	16,3	16,3	-
LD (ppm)	0,078	0,031	0,078
LQ (ppm)	0,26	0,10	0,26

3.1.5 - Sódio

A curva de calibração do Na é apresentada na Figura 3.5. Os valores dos desvios padrão relativos das absorvâncias foram baixos, tendo um valor máximo de 2,70 %, apresentando uma concentração mais baixa um valor de RSD de 8 %.

Na Tabela 3.7 apresentam-se os parâmetros calculados pelas diferentes regressões para os pontos experimentais. A regressão linear ponderada não foi um ajuste aplicável considerando o valor de coeficiente de determinação (0,0381) e o valor dos resíduos (aproximadamente 1).

Os ajustes por regressão linear e quadrática foram semelhantes considerando os coeficientes de determinação (0,998 para a regressão linear e

0,997 para a quadrática). Foi considerada a regressão linear para o traçado da curva de calibração (valor do SS_{res} mais baixo e teste de linearidade positivo).

A curva de calibração obtida para o Na foi Absorvância = $-0,0060 + 0,821C$, em que C é a concentração expressa em ppm. O valor do limite de detecção e de quantificação foi igual a 0,073 ppm e 0,24 ppm, respectivamente.

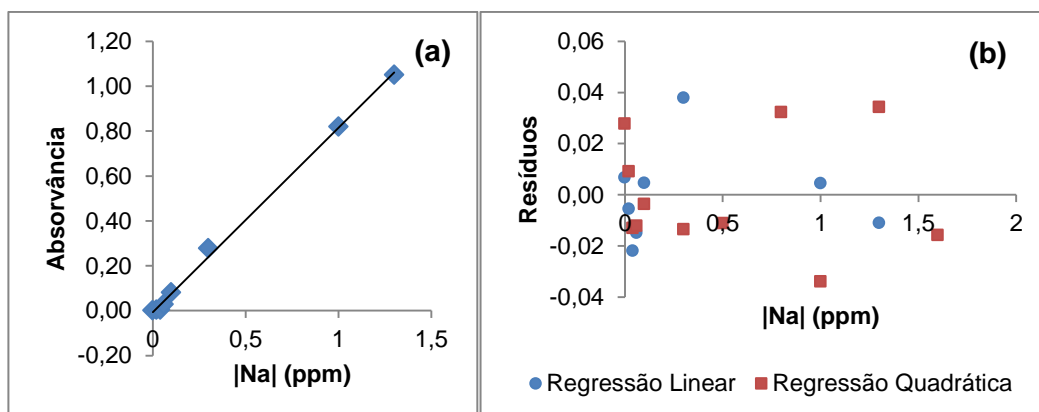


Figura 3.5 - (a) Curva de calibração para o Na e (b) gráfico dos resíduos.

Tabela 3.7 - Parâmetros experimentais para avaliação do método de regressão para traçado da curva calibração do Na.

	Regressão		
	Linear	Linear Ponderada	Quadrática
a	-0,0060	0,021	-2,60E-01
b	0,821	0,106	1,14
c	-	-	-0,0270
R^2	0,9980	0,0381	0,9974
S_y	1,9E-02	2,3E-01	2,5E-02
S_{x0}	2,4E-02	2,2	3,0E-02
V_{x0}	6,0	537	5,2
SS_{res}	2,4E-03	1,1	5,1E-03
DS^2	-8,14E-04	0,315	-
PG	1,3	49,3	-
F	16,3	16,3	-
LD (ppm)	0,073	6,4	0,068
LQ (ppm)	0,24	21,6	0,23

3.1.6 - Resumo dos métodos de análise

Pode-se assim apresentar um pequeno resumo dos valores e ajustes encontrados para cada um dos elementos analisados por F-CS-AAS na Tabela 3.8.

Para as análises do Ca e do Na foi obtido um melhor ajuste dos dados experimentais com a regressão linear, enquanto que para os restantes elementos (K, Mg e Mn) a regressão quadrática foi a utilizada. Os valores de coeficientes de determinação encontrados foram sempre superiores a 0,997, sendo o mais baixo o R^2 encontrado para o Ca. No que se refere à intercepção na origem podemos dizer que os valores encontrados foram sempre inferiores ao padrão mais baixo, com a excepção do Mg que teve um valor de branco da mesma ordem de grandeza do padrão inferior. Este facto pode ser observado pelo parâmetro “a” do ajuste que corresponde ao valor da intercepção com a origem para o ajuste linear, e o parâmetro “c” para o quadrático.

Tabela 3.8 - Resumo dos métodos de análise utilizados por F-CS-AAS.

Elemento	Ca	K	Mg	Mn	Na
Intervalo de Concentrações (ppm)	0,100 - 5,00	0,0800 - 2,00	0,0400 - 0,900	0,100 - 1,50	0,0200 - 1,30
Intervalo de Absorvâncias	0,015 - 0,282	0,051 - 0,989	0,075 - 0,837	0,0187 - 0,214	0,004 - 1,054
Tipo de Ajuste	Linear	Quadrático	Quadrático	Quadrático	Linear
a	0,0077	-6,22E-2	-2,70E-1	-2,96E-3	-0,0060
b	5,40E-2	6,16E-1	1.18	1,43E-1	8,21E-1
c	-	0,0014	0,070	0,0012	-
R^2	0,9976	0,9999	0,9993	0,9985	0,9980
LD (ppm)	0,32	0,013	0,025	0,078	0,073
LQ (ppm)	1,07	0,044	0,084	0,26	0,24

3.2 - Atomização electrotérmica

Para os diferentes elementos analisados por atomização electrotérmica (Cd, Co, Cu, Cr, Ni e Pb) foram realizadas várias curvas de calibração, para posterior quantificação desses elementos nas amostras. Ao longo do texto serão exemplificados os resultados só com uma curva de calibração para cada elemento (Tabela 3.14 à Tabela 3.13), sendo os resultados das restantes curvas apresentadas nos Anexos A.1 a A.4.

3.2.1 - Cobalto

Uma curva de calibração típica do Co é apresentada na Figura 3.6, indicando-se na Tabela 3.9 os parâmetros calculados para as diferentes regressões. As absorvâncias integradas médias apresentaram valores de RSD de 3 a 7 %.

Nas diferentes curvas verificou-se que os valores dos coeficientes de determinação obtidos para a regressão quadrática foram sempre superiores aos do ajuste linear. A regressão linear ponderada foi excluída por apresentar coeficientes de determinação não aceitáveis. Os valores dos somatórios dos quadrados dos resíduos evidenciaram melhor ajuste para a regressão quadrática. Apesar do teste de linearidade ter recomendado um tratamento linear para as várias curvas realizadas, foi considerado que o coeficiente de determinação e, em especial, o somatório do quadrado dos resíduos tem maior expressão. Como tal, o método da regressão quadrática foi o utilizado nas diversas curvas de calibração. Para o exemplo apresentado foi obtida a equação: $\text{Absorvância} = -2,55\text{E-}04\text{C}^2 + 1,82\text{E-}02\text{C} + 0,0027$. O limite de detecção calculado para este caso foi de 0,20 ppb e 0,67 ppb para o limite de quantificação, sendo este valor ligeiramente maior do que o menor padrão utilizado na calibração.

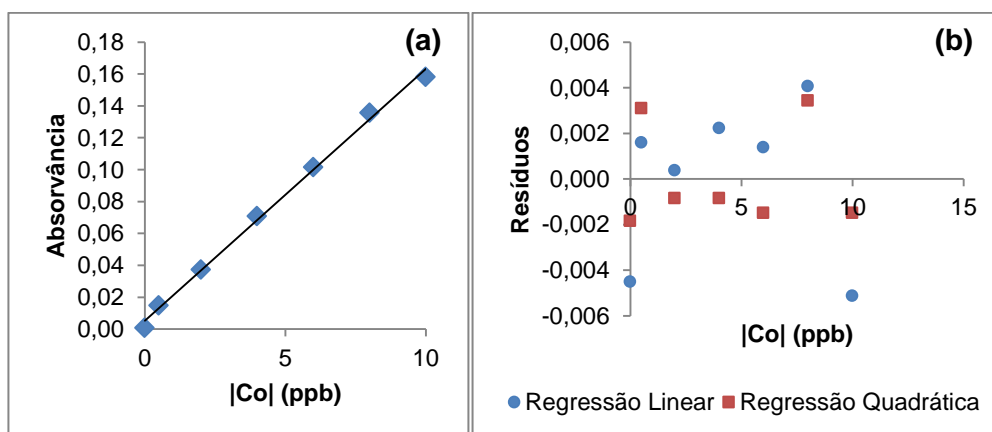


Figura 3.6 - (a) Curva de calibração para o Co e (b) gráfico dos resíduos.

Tabela 3.9 - Parâmetros experimentais para avaliação do método de regressão para traçado da curva calibração do Co.

	Regressão		
	Linear	Linear Ponderada	Quadrática
a	0,0053	0,0014	-2,55E-04
b	1,58E-02	1,69E-02	1,82E-02
c	-	-	0,0027
R ²	0,9967	0,3726	0,9986
S _y	3,8E-03	2,1E-03	2,8E-03
S _{x0}	2,4E-01	1,2E-01	1,7E-01
V _{x0} (%)	4,8	2,4	3,4
SS _{res}	7,3E-05	1,8E-04	3,1E-05
DS ²	4,21E-05	-8,61E-06	-
PG	5,50	1,12	-
F	21,2	21,2	-
LD (ppb)	0,73	0,37	0,20
LQ (ppb)	2,42	1,24	0,61

Os resultados referentes às restantes curvas de calibração são apresentados no Anexo A.1. Para todas as curvas efectuadas (6) a gama de concentração usada, bem como o número de padrões utilizados, foi sempre idêntico. A gama de absorvâncias variou entre $0,009 \pm 0,002$ e $0,11 \pm 0,03$ e valores de RSD de $1,8 \pm 0,9$ a $5,8 \pm 0,4$, sendo o ajuste predominante o quadrático. Foram obtidos valores de S_{x0} de $0,18 \pm 0,06$. Os valores médios dos parâmetros das equações de calibração foram: a = $-1,72E-04 \pm 8,9E-05$; b = $0,0125 \pm 0,003$; c = $0,0023 \pm 0,0007$; R² = $0,9987 \pm 0,0007$; LD = $0,18 \pm 0,01$ ppb e LQ $0,61 \pm 0,2$ ppb.

3.2.2 - Crómio

No estudo do Cr foram traçadas 6 curvas de calibração, baseadas nos resultados obtidos com 6 soluções padrão, com concentrações compreendidas entre 1,00 e 20,0 ppb (Anexo A.2). Os desvios padrão relativo, RSD, das três medições de cada solução foram baixos (valor máximo 2,6%).

Na Figura 3.7 e na Tabela 3.10 apresentam-se, como exemplo, os resultados obtidos para uma das curvas de calibração. Para a maioria das curvas analisadas o valor do coeficiente de determinação obtido para a regressão linear ponderada foi inferior a 0,9 e com uma variabilidade muito grande, sendo por isso considerado que este tratamento não era adequado.

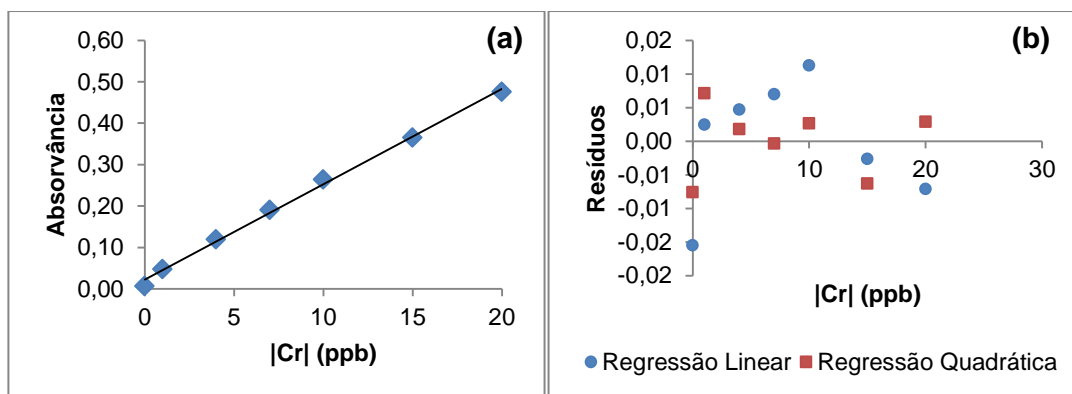


Figura 3.7 - (a) Curva de calibração para o Cr e (b) gráfico dos resíduos.

Tabela 3.10 - Parâmetros experimentais para avaliação do método de regressão para traçado da curva calibração do Cr.

	Regressão		
	Linear	Linear Ponderada	Quadrática
a	0,0230	0,0230	-1,76E-04
b	2,30E-02	2,31E-02	2,64E-02
c	-	-	0,0150
R ²	0,9971	0,9742	0,9990
S _y	1,0E-02	8,6E-03	6,4E-03
S _{x0}	0,43	0,37	0,29
V _{x0} (%)	4,6	3,9	2,9
SS _{res}	5,0E-04	5,0E-04	1,8E-04
DS ²	3,34E-04	2,03E-04	-
PG	8,02	4,88	-
F	21,2	21,2	-
LD (ppb)	1,30	1,12	0,073
LQ (ppb)	4,34	3,73	0,24

Verificou-se que a regressão quadrática foi o método que apresentou o melhor coeficiente de determinação e valores de SS_{res} mais favoráveis. Tal como para o Co, apesar de o teste de linearidade indicar uma relação linear dos dados experimentais nas várias curvas traçadas, optou-se por utilizar a regressão quadrática, tendo em conta os parâmetros R^2 e SS_{res} . Os limites de detecção e o de quantificação tiveram, respectivamente, valores de 0,073 ppb e 0,24 ppb. Esta última concentração era inferior à do menor padrão utilizado na calibração.

Os resultados referentes às restantes curvas de calibração são apresentados no Anexo A.2. Para a totalidade das curvas realizadas (6) a gama de concentração usada, bem como o número de padrões utilizados, foi sempre idêntico. Os valores de absorvâncias integradas variaram entre $0,039 \pm 0,014$ e $0,32 \pm 0,17$, com valores de RSD a variarem entre $1,3 \pm 0,8$ e $4,0 \pm 1,1$. Os valores médios dos parâmetros

das equações de calibração foram: $a = -1,3E-04 \pm 1,1E-04$; $b = 0,018 \pm 0,009$; $c = 0,011 \pm 0,008$; $R^2 = 0,9986 \pm 0,0014$; $S_{x0} = 0,34 \pm 0,2$; $LD = 0,08 \pm 0,03$ ppb e $LQ = 0,25 \pm 0,09$ ppb.

3.2.3 - Cobre

Na Figura 3.8 e na Tabela 3.11 apresentam-se, respectivamente, os valores experimentais de uma curva de calibração do Cu e os parâmetros calculados para as três regressões. Os desvios padrão relativos das absorvâncias integradas tiveram um valor máximo de 4,1 %, com a exceção do padrão mais diluído (2 ppb) que teve um RSD de 13 %.

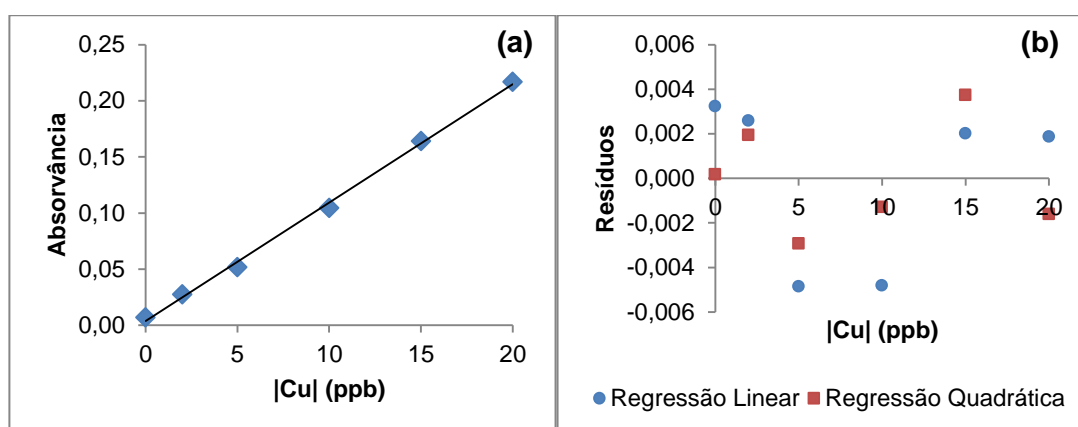


Figura 3.8 - (a) Curva de calibração para o Cu e (b) gráfico dos resíduos.

Tabela 3.11 - Parâmetros experimentais para avaliação do método de regressão para traçado da curva calibração do Cu.

	Regressão		
	Linear	Linear Ponderada	Quadrática
a	0,0036	0,0045	6,78E-05
b	1,06E-02	1,04E-02	9,22E-03
c	-	-	0,0067
R^2	0,9979	0,9924	0,9991
S_y	4,2E-03	4,4E-03	3,2E-03
S_{x0}	0,40	0,42	0,30
V_{x0} (%)	3,8	4,0	2,9
SS_{res}	7,1E-05	7,9E-05	3,0E-05
DS^2	4,09E-05	4,66E-05	-
PG	4,01	4,57	-
F	34,1	34,1	-
LD (ppb)	1,2	1,3	0,076
LQ (ppb)	4,0	4,2	0,025

Os valores de coeficiente de determinação foram idênticos para o ajuste linear e linear ponderado, tendo sido obtido um valor mais elevado para a regressão quadrática. Os SS_{res} foram semelhantes para os três métodos de regressão. Apesar do teste de linearidade ter dado positivo ($PG < F$), a regressão quadrática foi considerada a mais adequada para o traçado da curva de calibração, tendo com base os resultados dos resíduos (Figura 3.8 (b)), dos de SS_{res} e dos R^2 .

Os resultados referentes às restantes curvas de calibração são apresentados no Anexo A.3. Para as 3 curvas de calibração traçadas, foi usado o mesmo número de padrões, bem como a mesma gama de concentrações. Para este elemento foram obtidos valores de absorvância que variaram entre $0,023 \pm 0,016$ e $0,12 \pm 0,094$ e valores de RSD entre $1,2 \pm 0,21$ % e $4,5 \pm 0,51$.

Os valores médios dos parâmetros obtidos para as várias curvas de calibração foram: $a = 3,93E-05 \pm 4,60E-05$; $b = 4,08E-03 \pm 4,48E-03$; $c = 0,0040 \pm 0,0024$; $R^2 = 0,9969 \pm 0,0025$; $S_{x_0} = 0,397 \pm 0,20$; $LD = 0,043 \pm 0,03$ ppb e $LQ = 0,33 \pm 0,27$ ppb.

3.2.4 - Níquel

Na Figura 3.9 e na Tabela 3.12 apresentam-se, respectivamente, os valores experimentais de uma curva de calibração do Ni e os parâmetros calculados para as duas regressões. Os valores de RSD para as absorvâncias medidas foram baixos, tendo sido obtido um valor máximo de 2,6 % tendo o padrão de menor concentração (3 ppb) um valor de RSD de 8,5%.

Os valores de R^2 obtidos foram muito bons para ajuste com regressão quadrática, bons para a linear, e ligeiramente inferior para a linear ponderada.

O método da regressão quadrática foi considerado o mais adequado para o traçado da curva de calibração. Este apresentou valores de SS_{res} significativamente mais baixos do que os da regressão linear e a linear ponderada, embora os valores de R^2 e de V_{x_0} , tenham sido semelhantes, apesar de o teste de linearidade tenha dado positivo ($PG < F$). Os limites de detecção e quantificação, para o ajuste quadrático, tiveram valores de 0,020 ppb e 0,067 ppb.

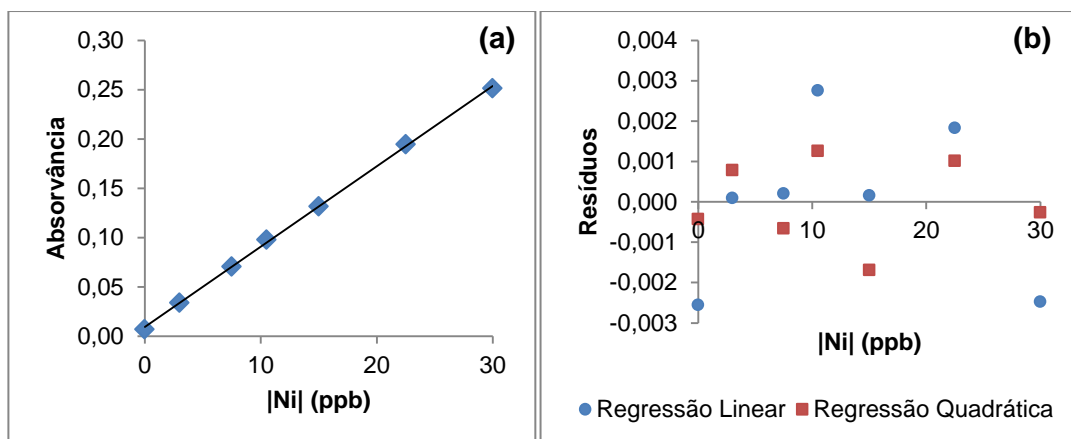


Figura 3.9 - (a) Curva de calibração para o Ni e (b) gráfico dos resíduos.

Tabela 3.12 - Parâmetros experimentais para avaliação do método de regressão para traçado da curva calibração do Ni.

	Regressão		
	Linear	Linear Ponderado	Quadrática
a	0,0094	0,011	-1,78E-05
b	8,15E-03	8,17E-03	8,68E-03
c	-	-	0,0073
R ²	0,9995	0,9987	0,9999
S _y	2,2E-03	1,8E-03	1,3E-03
S _{x0}	0,27	0,22	0,16
V _{x0} (%)	1,8	1,5	1,1
SS _{res}	2,4E-05	5,0E-05	6,8E-06
DS ²	1,69E-05	9,83E-06	-
PG	10	5,82	-
F	21,2	21,2	-
LD (ppb)	0,80	0,67	0,020
LQ (ppb)	2,67	2,23	0,067

Os resultados referentes à outra curva realizada são apresentados no Anexo A.4. Nesta curva de calibração foi usado o mesmo número de padrões e a mesma gama de concentrações. Os valores de absorvância variaram entre $0,031 \pm 0,004$ e $0,24 \pm 0,012$ e os de RSD entre $1,1 \pm 0,84 \%$ e $7,6 \pm 1,2 \%$.

Os valores médios dos parâmetros obtidos para as duas curvas de calibração foram: $a = -2,6E-05 \pm 1,2E-05$; $b = 0,0070 \pm 0,0024$; $c = 0,015 \pm 0,011$; $R^2 = 0,9986 \pm 0,002$; $S_{x0} = 0,49 \pm 0,46$; $LD = 0,019 \pm 0,0021$ ppb e $LQ = 0,063 \pm 0,0069$ ppb.

3.2.5 - Chumbo

Utilizaram-se 5 soluções padrão para o traçado da curva de calibração, com concentrações compreendidas entre os 7,50 ppb e os 30,0 ppb. A absorvância integrada máxima foi de 0,257. Os valores de RSD obtidos para as absorvâncias medidas foram de 1 a 16% aproximadamente. Na Figura 3.10 e na Tabela 3.13 apresentam-se os valores experimentais e parâmetros das curvas de regressão para calibração do chumbo.

No que se refere aos ajustes, para este elemento os melhores valores foram obtidos para o ajuste linear ponderado, com um valor de coeficiente de correlação de 0,9999 e um valor de SS_{res} de 2,7E-04. Apesar do valor de SS_{res} ser inferior no ajuste quadrático escolheu-se o linear ponderado, uma vez que o R^2 foi mais favorável ao ajuste linear ponderado. Como o teste de linearidade deu positivo ($PG < F$) para o ajuste linear ponderado este foi o ajuste escolhido. Desta maneira foi obtida a seguinte equação da curva: $Absorvância = 0,0153 + 8,31E-03 C_w$, sendo C_w o valor da concentração ponderada.

Para o ajuste linear ponderado os valores de limite de detecção e de quantificação foram de 1,45 ppb e 4,85 ppb, respectivamente.

Não são apresentados os resultados de outras curvas de calibração pois nas várias tentativas realizadas os valores das absorvâncias medidas eram absurdos e apresentavam desvios elevados. De referir que este elemento está sujeito a grandes contaminações ambientais, sendo de relevar o tabaco e produtos de higiene pessoal. [63]

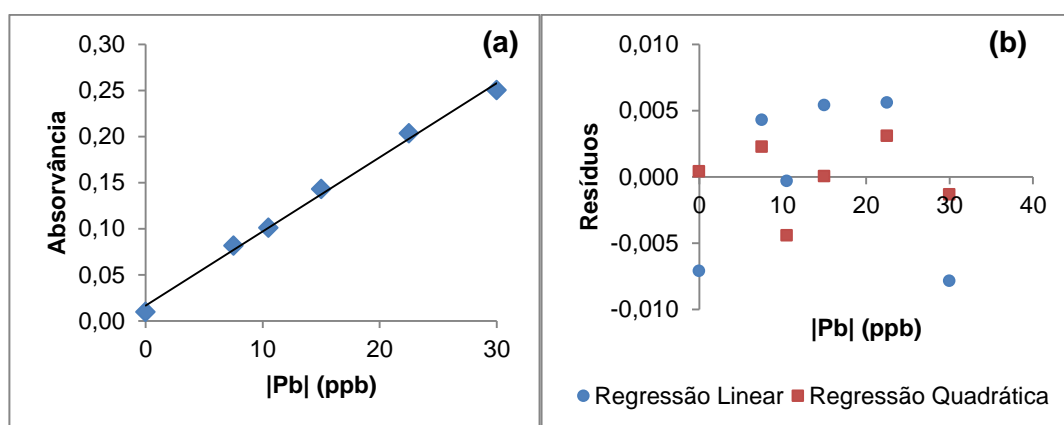


Figura 3.10 - (a) Curva de calibração para o Pb e (b) gráficos dos resíduos.

Tabela 3.13 - Parâmetros experimentais para avaliação do método de regressão para traçado da curva calibração do Pb.

	Regressão		
	Linear	Linear Ponderado	Quadrática
a	0,0160	0,0150	-5,50E-05
b	8,04E-03	8,31E-03	9,72E-03
c	-	-	0,0091
R ²	0,9949	0,9999	0,9990
S _y	6,9E-03	4,0E-03	3,5E-03
S _{x0}	0,86	0,48	0,44
V _{x0} (%)	5,0	2,8	2,6
SS _{res}	1,9E-04	2,7E-04	3,6E-05
DS ²	1,55E-04	2,88E-05	-
PG	12,8	2,40	-
F	34,1	34,1	-
LD (ppb)	2,58	1,45	0,039
LQ (ppb)	4,15	4,85	0,13

3.2.6 - Cádmi

A curva de calibração do Cd é apresentada na Figura 3.11. Os parâmetros calculados nos três métodos de regressão estudados estão indicados na Tabela 3.14. Os valores de RSD para as absorvâncias medidas variaram entre 0,52 % e 3,4 %, embora tenham sido obtidos valores de 18 % para os dois padrões mais diluídos.

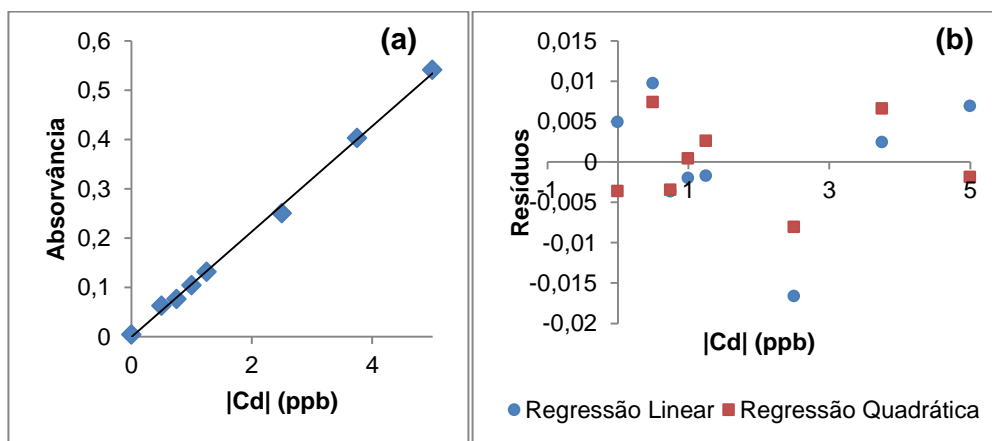


Figura 3.11 - (a) Curva de calibração para o Cd e (b) gráfico dos resíduos.

Tabela 3.14 - Parâmetros experimentais para avaliação do método de regressão para traçado da curva calibração do Cd.

	Ajuste para uma Regressão		
	Linear	Linear Ponderada	Quadrática
a	-0,0005	-0,7200	2,76E-03
b	1,07E-01	2,52E-01	9,32E-02
c	-	-	0,0080
R ²	0,9981	0,0005	0,9992
S _y	8,8E-03	0,45	6,3E-03
S _{x0}	8,3E-02	1,8	6,0E-02
V _{x0} (%)	3,9	85	2,9
SS _{res}	0,0005	2,1	0,00020
DS ²	2,71E-04	1,22	-
PG	6,82	3,1E+04	-
F	16,3	16,3	-
LD (ppb)	0,25	5,36	0,15
LQ (ppb)	0,83	17,9	0,51

O estudo estatístico por regressão linear ponderada foi rejeitado, uma vez que o valor de R² deu extremamente baixo e os resíduo (SS_{res}) obtidos eram muito elevados.

A regressão quadrática apresentou valores ligeiramente melhores de R², da soma dos resíduos e de V_{x0} do que os da regressão linear. Assim, e embora o teste de linearidade tenha indicado uma relação linear para o ajuste dos valores experimentais, o método da regressão quadrática foi o escolhido, pelas razões apresentadas anteriormente.

Os valores de limite de detecção e quantificação obtidos foram de 0,15 ppb e 0,51 ppb, respectivamente.

Os resultados do tratamento estatístico para o intervalo de absorvâncias mais apertado (Abs ca. 0 - 0,25) são apresentados na Tabela 3.15. Para este intervalo a regressão linear já apresentava um ajuste idêntico ao da quadrática.

Tabela 3.15 - Parâmetros experimentais para avaliação do método de regressão para traçado da curva calibração do Cd para uma gama de absorvância inferior.

	Regressão		
	Linear	Linear Ponderada	Quadrática
a	0,0074	0,0045	-1,36E-03
b	9,75E-02	0,100	0,101
c	-	-	0,0060
R ²	0,9977	0,9965	0,9979
S _y	4,4E-03	3,8E-02	4,9E-03
S _{x0}	4,5E-02	3,8E-02	5,0E-02
V _{x0} (%)	3,8	3,2	4,2
SS _{res}	7,9E-05	1,2E-04	7,3E-05
DS ²	-4,40E-05	-63,1	-
PG	1,80	25,9	-
F	34,1	34,1	-
LD (ppb)	0,14	11,4	0,13
LQ (ppb)	0,45	37,9	0,44

Tal como para o Pb este elemento está sujeito a grandes contaminações ambientais, sendo de relevar o tabaco, produtos de higiene pessoal, entre outros e não se conseguiram curvas de calibração com valores aceitáveis [64].

3.3 - Quantificação dos metais nos extractos de chás e infusões

A análise dos metais em estudo nas amostras foram feitas com as rectas realizadas no próprio dia de análise e por norma em triplicado de forma a ter uma maior segurança nos resultados obtidos. Para o método F-CS-AAS foi realizada apenas uma recta por elemento e foram analisados apenas 4 dos chás, todos eles com digestão ácida. Para o método de atomização electrotérmica (GF-CS-AAS), ao qual foi dedicado mais tempo de estudo, foi analisada a totalidade das amostras. Foi também realizada uma comparação entre as concentrações de algumas amostras digeridas e não digeridas para observar a influência deste facto na obtenção de resultados. É de salientar que o peso média das folhas de chá utilizadas nas amostras foi de $1,274 \pm 0,291$ g por saqueta.

3.3.1 - Atomização por chama

As concentrações e respectivos RSD das três réplicas analisadas, para o Ca, K, Mg, Mn e Na, são apresentados na Tabela 3.16. De referir que se verificou que dentro da mesma amostra as saquetas apresentavam diferentes massas, o que poderá justificar os desvios nas concentrações. Verificou-se que a amostra 8 (infusão de chá verde com algas) conduziu a resultados com uma maior dispersão, em particular para o K e Na, sais presentes na água do mar. Não foi possível analisar o Na na solução mais concentrada (FD=5) das amostras 2 e 4 por não se dispor de mais solução uma vez que só se procedeu a uma digestão ácida. Deve-se ainda referir que para o Ca, nas amostras 2 e 4, não foi possível efectuar a quantificação pelo facto de os valores de concentração serem inferiores ao LQ do método (1,07 ppm). O mesmo aconteceu para a amostra 9 para o Mn em que a concentração foi inferior ao limite de detecção do método (0,08 ppm).

Tabela 3.16 – Concentrações (ppm) das soluções amostras analisadas por F-CS-AAS e respectivos factores de diluição (F.D.).

Amostra	Ca			K			Mg			Mn			Na		
	Conc.	RSD (%)	F.D.	Conc.	RSD (%)	F.D.	Conc.	RSD (%)	F.D.	Conc.	RSD (%)	F.D.	Conc.	RSD (%)	F.D.
2	< LD	-	5	0,25	9,23	55	0,20	4,5	10	0,3	9,3	5	< LD	-	10
4	< LD	-	5	0,3	8,0	55	0,21	9,2	10	0,3	22,0	5	< LD	-	10
8	2,44	8,16	5	0,19	34,7	55	0,38	32,3	10	0,06*	37	5	0,59	46,2	15
9	1,13	23,2	10	0,35	9,8	55	0,53	16,8	10	< LD	-	5	0,44	11,3	15

*inferior ao LQ

Na Tabela 3.17 apresentam-se os resultados obtidos para os ensaios de recuperação por F-CS-AAS dos 5 elementos, em cada amostra (valores médios das três réplicas). Para o Mg, Mn, Na e K a exactidão do método foi aceitável, com valores médios por elemento de REC < 120 %. Para o Ca as recuperações médias (153 %) indicaram que era recomendável a análise pelo método de adição de padrão, para eliminar possíveis efeitos de matriz, no entanto não foi realizado por não haver amostra disponível.

Tabela 3.17 - Percentagens de recuperação (e respectivos RSD%) para as amostras analisadas por F-CS-AAS.

Amostra	Ca	K	Mg	Mn	Na
2	-	107 (± 6 %)	104 % (± 2 %)	100 % (± 20 %)	117 % (± 3 %)
4	-	125 (± 23 %)	102 % (± 4 %)	127 % (± 9 %)	120 % (± 3 %)
8	147 (± 6 %)	129 % (± 16 %)	100 % (± 1 %)	120 % (± 10 %)	96 % (± 16 %)
9	159 (± 17 %)	118 % (± 5 %)	96 % (± 7 %)	115 % (± 4 %)	96 % (± 2 %)
Média	153 %	120 %	101 %	117 %	107 %

Na Figura 3.12 apresentam-se as concentrações obtidas para as diferentes amostras analisadas (2, 4, 8 e 9). Pode-se observar que foi encontrado um maior teor de Ca, Mg e Na nas amostras contendo algas na sua composição (8 e 9), que coincide com os elementos maioritários da água do mar. Teores idênticos de Mn e Mg foram obtidos para as amostras 2 e 4, no entanto, os de Mn são superiores aos encontrados nos chás contendo algas.

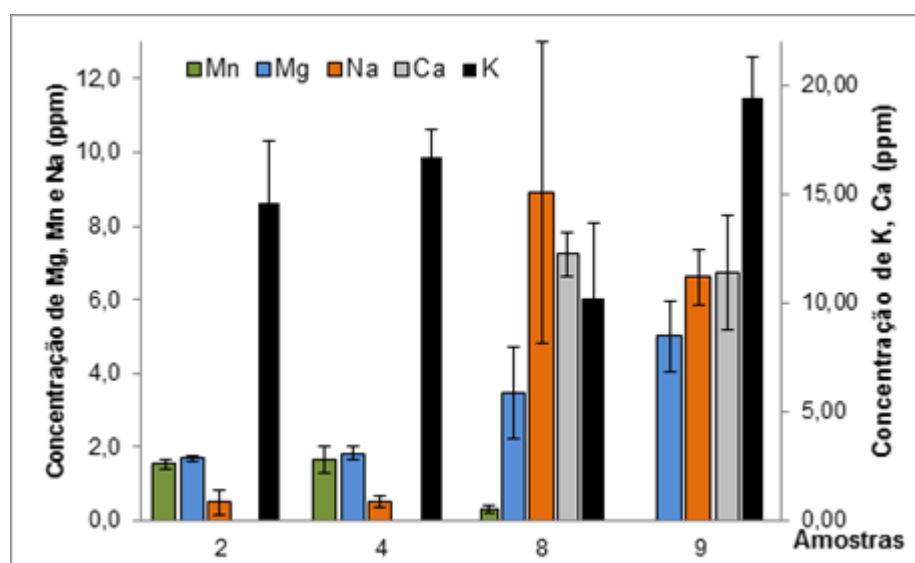


Figura 3.12 - Concentrações de metais nas amostras por F-CS-AAS.

Para os elementos analisados por F-CS-AAS o Mg, Na e Ca tiveram abaixo dos limites legislados (Mg = 50 ppm, Na = 200 ppm, Ca = 100 ppm). De todos os elementos a exceção foi o Mn (com limite legislado de 50 ppb) para as amostras 2 e 4. Deve-se ainda salientar que para o K nada se pode concluir, no que se refere á comparação com os valores legislados, uma vez que o valor legislado para este elemento não se encontra documentado.

3.3.2 - Atomização electrotérmica

O estudo dos métodos por GF-CS-AAS foi realizado com as soluções (com e sem digestão ácida) das amostras 2, 4, 8 e 9. Soluções não digeridas das amostras 1, 3, 5, 6 e 7 também foram quantificadas.

3.3.2.1 - Cobalto

Na Tabela 3.18 apresentam-se as concentrações médias de Co das três soluções de cada amostra, para avaliar a necessidade de efectuar a digestão. De referir que os teores de Co nas amostras com digestão apresentaram valores inferiores ao LD (0,2 ppb), porque estas soluções estavam diluídas 5 vezes. Para este elemento não foram realizados os testes de recuperação.

Tabela 3.18 – Concentração de Co em soluções amostra antes e após digestão, e respectivos RSD por GF-CS-AAS.

Amostra	Co (ppb)	
	Após digestão	Antes da digestão
2	<LD	0,72 (± 16 %)
4	0,65 (± 22 %)*	0,93 (± 15 %)
8	< LD	0,20 (± 17 %)*
9	< LD	0,23 (± 19 %)*

* inferior ao LQ

Os resultados das análises das restantes amostras (sem réplicas) são indicadas na Tabela 3.19. As amostras 1 e 5 tiveram teores de concentração inferiores ao LD do método; a 6 e a 7 apresentaram valores da ordem do LQ.

Os valores das concentrações para as amostras analisadas são mostrados na Figura 3.13. A amostra que obteve uma maior concentração foi a 3, que continha algas na sua composição. A concentração de todas as amostras para este elemento esteve abaixo do teor inferior ao limite legislado (50 ppb).

Tabela 3.19 - Concentração de Co nas amostras (sem digestão) por GF-CS-AAS.

Amostra	Co (ppb)
1	< LD
3	1,27
5	< LD
6	0,61*
7	0,63 *

* inferior ao LQ

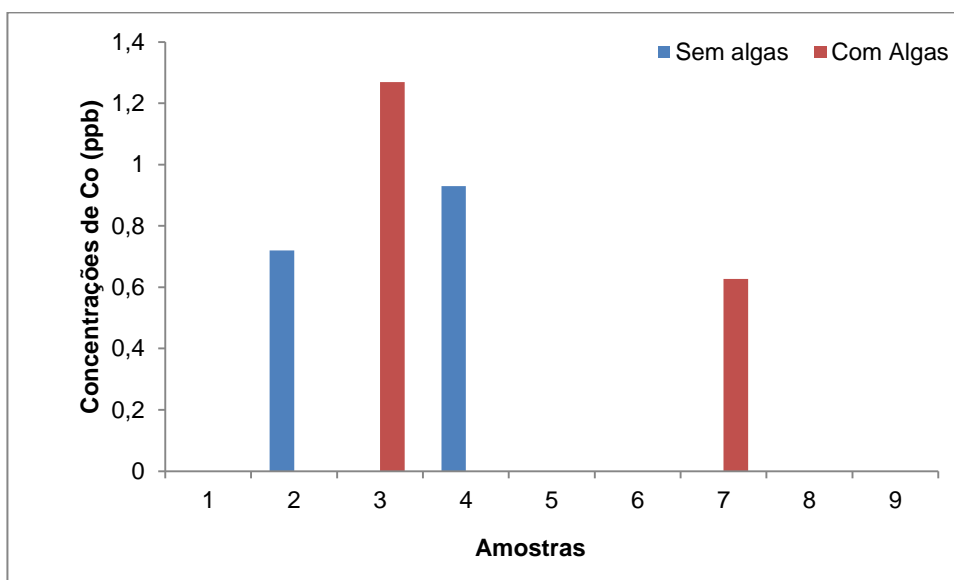


Figura 3.13 - Concentração de Co nas infusões de chás e ervas aromáticas por GF-CS-AAS.

3.3.2.2 - Crómio

Na Tabela 3.20 apresentam-se as concentrações médias (três réplicas) de Cr em soluções das amostras que foram digeridas. Com a excepção da amostra 9, foram obtidos teores de Cr mais elevados nas soluções após digestão, verificando-se um valor 9 vezes superior na amostra 8. Este facto leva a crer que para este elemento foi importante a realização da digestão ácida, uma vez que sem a mesma, a quantificação das amostras não seria correcta, levando a erros na determinação da concentração nas amostras.

Tabela 3.20 - Concentração de Cr (e respectivos RSD) em soluções amostra, antes e após digestão por GF-CS-AAS e resultados dos ensaios de recuperação.

Amostra	Infusões após digestão		Infusões antes da digestão
	Cr (ppb)	Recuperação	Cr (ppb)
2	7,05 (± 40 %)	109	0,81 (± 10 %)
4	9,36 (± 29 %)	118	3,76 (± 11 %)
8	11,82 (± 45 %)	94	1,23 (± 61 %)
9	2,29 (± 32 %)	102	0,50 (± 38 %)

No que se refere às percentagens de recuperação encontradas (Tabela 3.20), é possível verificar que os valores estiveram dentro dos parâmetros desejados (valores entre 94 % e 118 %), revelando uma boa exactidão do método. Para a mesma amostra obtiveram-se valores de concentração diferentes nas infusões (réplicas) analisadas (RSD médios de 37 ± 7 % e 30 ± 24 % para as soluções com e sem digestão, respectivamente).

Com base nestes resultados constatou-se que a quantificação do Cr deveria ter sido efectuada após a digestão ácida das infusões. Na Tabela 3.21 apresentam-se os teores obtidos nas infusões das restantes amostras (sem digestão e sem réplicas).

Tabela 3.21 - Concentração de Cr em infusões (não digeridas) de algumas amostras por GF-CS-AAS.

Amostra	Cr (ppb)
1	5,72
3	10,1
5	7,57
6	6,18
7	27,3

A Figura 3.14 mostra as concentrações relativas de Cr para as infusões (sem digestão ácida) das 9 amostras estudadas. A amostra 7 foi a que apresentou uma concentração mais elevada (27,1 ppb). De um modo geral podemos verificar que as amostras contendo algas (3, 7, 8 e 9) tiveram concentrações médias (9,8 ppb) mais elevadas (concentração média de 4,1 ppb para as amostras 1, 2, 4, 5 e 6). Contudo a amostra apresentou uma concentração da ordem de grandeza das amostras 2 e 4.

Comparando os valores obtidos nas amostras com o limite legislado (50 ppb), podemos dizer que este valor não foi ultrapassado em nenhuma das amostras.

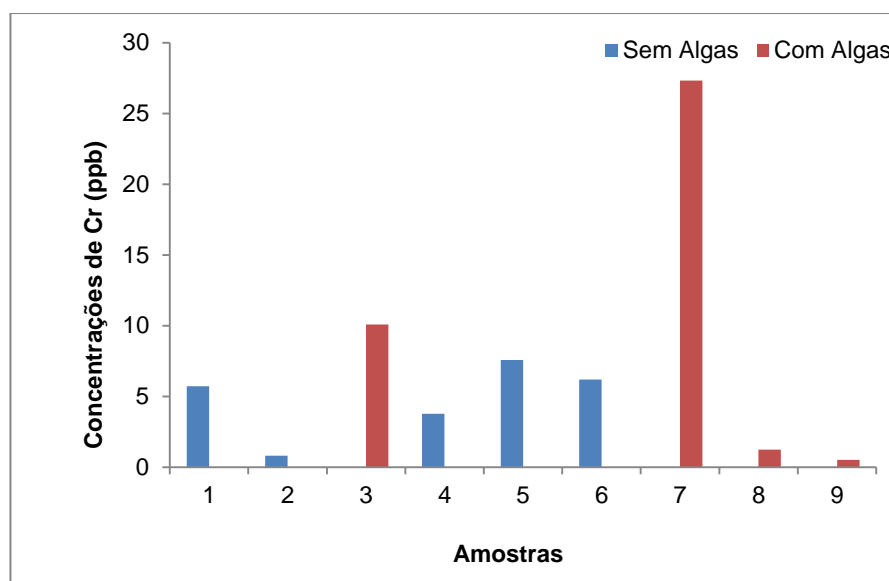


Figura 3.14 - Concentração de Cr nas infusões de chás e ervas aromáticas por GF-CS-AAS.

3.3.2.3 - Cobre

Na Tabela 3.22 apresentam-se as concentrações médias (três réplicas) de Cu em infusões de amostras que foram sujeitas à digestão ácida e infusões sem tratamento. Na mesma tabela também se mostram os resultados dos ensaios de recuperação. Com valores a variar entre os 94 % e 96 % evidenciaram que na análise deste elemento não ocorriam efeitos matriz nas amostras digeridas.

Tabela 3.22 - Concentração de Cu em infusões após digestão (e respectivos RSD de três réplicas) e em infusões antes da digestão.

Amostra	Infusões após digestão		Infusões antes da digestão
	Cu (ppb)	Recuperação	Cu (ppb)
2	46,67 (± 16 %)	94	64,4
4	44,12 (± 31 %)	96	33,3
8	24,32 (± 30 %)	94	24,7
9	27,99 (± 22 %)	96	22,4

As concentrações das três infusões do mesmo chá apresentaram RSD médios de 25 ± 5 %. Estes valores são concordantes com os valores obtidos para o Cr, confirmando que a mesma amostra apresenta diferenças quantitativas significativas para as diferentes as saquetas de chá (ou erva aromatizada), tal como atrás referido.

Embora os resultados apresentados para as análises com e sem digestão (Tabela 3.22) tenham sido obtidos para diferentes infusões, verifica-se que na amostra 2 a concentração da infusão digerida é bastante inferior à da infusão sem tratamento (diferença de cerca de 18 ppb entre ambas), enquanto nas amostras 4 e 9 o resultado oposto foi observado. Por outro lado na amostra 8 as concentrações foram semelhantes para as duas preparações. Com estas diferenças admitiu-se que a digestão não seria necessária para a análise de Cu em infusões.

Na Tabela 3.23 e na Figura 3.15 mostram-se os resultados das análises de Cu para as várias amostras (infusões de chás e de ervas aromatizadas). A infusão da amostra 7 (ervas e algas) foi a que apresentou o menor teor de Cu e as amostras 1 a 4 os valores mais elevados.

Para o Co, tal como para o Cr, nenhuma das amostras ultrapassaram o limite legislado de 50 ppb.

Tabela 3.23 - Análises por GF-CS-AAS de Cu em infusões de chás não digeridas.

Amostra	Cu (ppb)
1	34,2
3	41,8
5	21,4
6	18,2
7	4,96

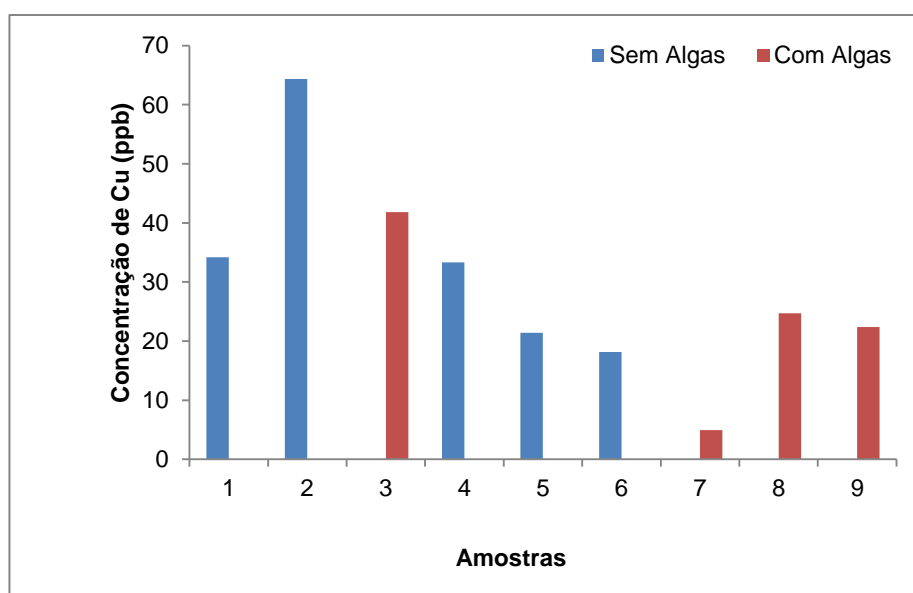


Figura 3.15 - Concentração de Cu nas infusões de chás e ervas aromáticas por GF-CS-AAS.

3.3.2.4 - Níquel

Na Tabela 3.24 apresentam-se as concentrações médias (três réplicas) de Ni em infusões submetidas a digestão (e respectivos ensaios de recuperação), assim como concentrações em infusões da mesma amostra não tratada.

Tabela 3.24 - Concentração de Ni em infusões após a digestão (e respectivos RSD de três réplicas) e em concentrações infusões antes da digestão.

Amostra	Infusões após digestão		Infusões antes da digestão
	Ni (ppb)	Recuperação	Ni (ppb)
2	32,6 (± 8 %)	78	41,3
4	30,3 (± 1 %)	77	34,2
8	6,93 (± 25 %)	77	23,3
9	6,44 (± 10 %)	76	12,6

Os valores obtidos de RSD para as três réplicas foram aceitáveis atingindo uma vez o valor máximo para a amostra 8 (RSD = 25 %).

Obtiveram-se valores de recuperação baixos, da ordem dos 77 %, o que poderá indicar que a quantificação do Ni nas amostras deveria ser efectuada pelo método da adição de padrão. Embora os resultados apresentados para as análises com e sem digestão (Tabela 3.24) tenham sido obtidos para diferentes infusões, observaram-se valores mais elevados para as infusões que não tiveram tratamento de digestão ácida. Estes factos indicaram que o método de análise do Ni teria de ser optimizado, e em particular, averiguar o programa de digestão ácida por microondas das amostras.

Na Tabela 3.25 são apresentados os teores de Ni para as restantes soluções amostra (uma infusão por amostra) que não tiveram nenhum tratamento de digestão. Na Figura 3.16 podem-se observar os valores de concentração de Ni para todas as amostras que não foram digeridas.

Tabela 3.25 - Análises por GF-CS-AAS de Ni em infusões de chás não digeridas.

Amostra	Ni (ppb)
1	18,1
3	65,2
5	16,5
6	21,8
7	15,2

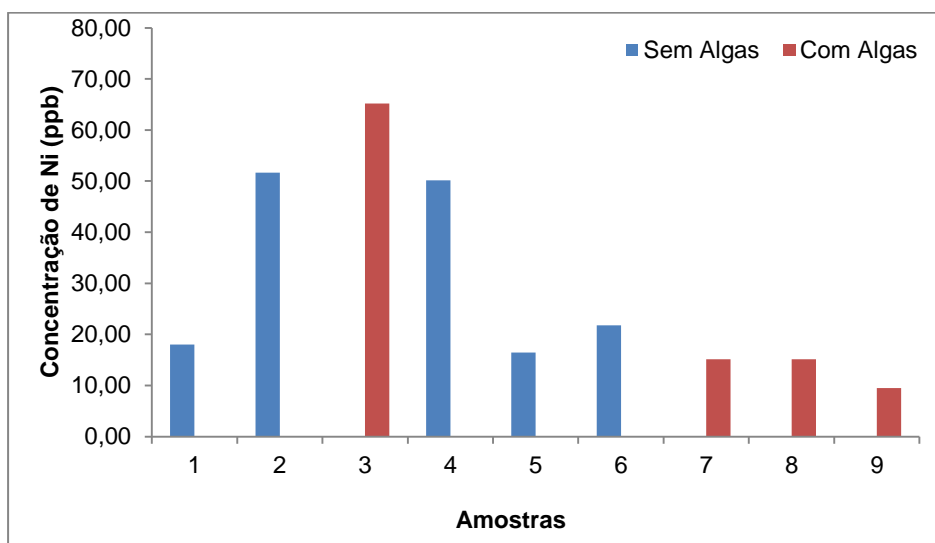


Figura 3.16 - Concentração de Ni nas amostras (infusões sem digestão ácida) por GF-CS-AAS.

Verifica-se que as amostras apresentaram concentrações de Ni muito dispersas (de 13 a 65 ppb), não permitindo correlacionar a composição das infusões com a concentração de Ni, em particular a presença de algas.

As amostras 2, 3 e 4 apresentaram os valores mais elevados de concentração de Ni. Das amostras analisadas 5 já apresentaram valores superiores ao limite legislado (20 ppb), contudo como o método de quantificação apresentou recuperações médias de 77%, foi admitido que os chás e ervas aromatizadas estudados apresentavam teores preocupantes de Ni.

3.3.2.5 - Cádmió e Chumbo

Para o cádmio as percentagens de recuperação foram muito baixas, variaram entre os 60 % e os 18 %, sendo o valor médio de 38 %. Para o Pb as percentagens de recuperação variaram entre os 133 % e os 111 %, com um valor médio de 122 %. Estes factos evidenciaram que nestas medições o efeito da matriz das amostras provocava interferências, e que a quantificação do Cd e Pb nas amostras deveriam ter sido realizadas pelo método da adição de padrão.

Para os elementos Cd e Pb as concentrações encontradas nas amostras foram inferiores aos limites de detecção dos métodos (0,15 e 1,45 ppb, respectivamente).

Considerando que as limitações dos métodos utilizados para estes dois elementos e os resultados obtidos foi admitido que os valores de Cd e Pb eram inferiores aos valores legislados (5 ppb para o Cd e 25 ppb para o Pb).

Para estes elementos, podemos assim afirmar que seria necessário um estudo mais aprofundado das amostras de forma a obter resultados mais conclusivos e eliminar os problemas existentes na análise dos mesmos.

3.3.3 - Considerações finais

Na Tabela 3. 26 indicam-se as concentrações dos metais nas amostras analisadas: chá verde (amostra 2), chá preto (4), infusões de lima (amostra 5), de camomila (amostra 1), mistura de chá e ervas (amostra 6) e misturas contendo algas (amostras 3, 7, 8 e 9). A legislação utilizada foi a de água para consumo humano [49] por não existir uma específica para chás ou infusões.

Tendo em conta os limites legislados verificou-se que todas as amostras apresentaram concentrações preocupantes de Ni, bem como de Mn para as amostras 2 e 4 sem algas na sua constituição.

Todas as amostras contendo algas apresentaram teores de Ca, Mg e Na superiores aos das amostras sem algas na sua constituição. Para os restantes elementos não foi possível relacionar as concentrações com a composição das infusões, em particular a presença de algas.

Tabela 3. 26 - Resultados experimentais para os vários elementos analisados

Amostra	Algas	Ca (ppm)	K (ppm)	Mg (ppm)	Mn (ppm)	Na (ppm)	Co (ppb)	Cr (ppb)	Cu (ppb)	Ni (ppb)	Pb (ppb)
1	N	na	na	na	na	na	< LD	5,72	34,2	>18,1	< LD
2	N	< LD	0,25	0,20	0,3	< LD	0,72	0,81	64,4	>41,3	< LD
3	S	na	na	na	na	na	1,27	10,1	41,8	>65,2	< LD
4	N	< LD	0,3	0,21	0,3	< LD	0,93	3,76	33,3	>34,2	< LD
5	N	na	na	na	na	na	< LD	7,57	21,4	>16,5	< LD
6	N	na	na	na	na	na	0,61*	6,18	18,2	>21,8	< LD
7	S	na	na	na	na	na	0,63*	27,3	4,96	>15,2	< LD
8	S	<0,24	0,19	0,38	0,06*	0,59	0,20	1,23	24,7	>23,3	< LD
9	S	<1,13	0,35	0,53	< LD	0,44	0,23	0,50	22,4	>12,6	< LD
	Limite Legislado	100	-	50	0,05	200	50	50	2000	20	25

*inferior ao LQ; na - amostra não analisadas

4 - Conclusões e sugestões para trabalho futuro

Para a análise dos elementos em infusões de chás e ervas aromáticas, utilizou-se um espectrofotómetro de absorção atómica com fonte contínua. A atomização em chama foi a técnica utilizada para a quantificação do Ca, K, Mg, Mn e Na. A atomização electrotérmica foi usada para o Cd, Co, Cr, Cu, Ni e Pb.

Foi realizado um estudo estatístico para avaliar qual o tratamento matemático que melhor se ajustava aos resultados experimentais de modo a calcular a equação da curva de calibração. Verificou-se que a regressão quadrática era a mais adequada para o potássio, o magnésio, o manganês, o cobalto, o crómio, o cobre, o níquel e o cádmio e a regressão linear para o cálcio e sódio. Para o chumbo a regressão linear ponderada foi a que apresentou um melhor ajuste.

Os limites de detecção médios e respectivos desvios padrão para as determinações foram: Ca - 0,32 ppm ($m=1$); K - 0,13 ppm ($m=1$); Mg - 0,025 ppm ($m=1$); Mn - 0,078 ppm ($m=1$); Na - 0,073 ppm ($m=1$); Co - $0,18 \pm 0,01$ ppb ($m=6$); Cr - $0,08 \pm 0,03$ ppb ($m=6$); Cu - $0,33 \pm 0,27$ ppb ($m=3$); Ni - $0,019 \pm 0,0021$ ppb ($m=2$); Pb - 1,45 ppb ($m=1$); Cd - 0,15 ppb ($m=1$).

Os valores médios obtidos nos ensaios de recuperação do Mg, Na, Mn, Cr e Cu foram 101 %, 117 %, 107 %, 106 % e 95 %, respectivamente. Para o Ca, Pb, K, Ni e Cd as percentagens dos ensaios de recuperação foram 153 %, 122 %, 120 %, 77 %, 38 %, respectivamente. Nestas determinações o método de adição padrão deveria ter sido utilizado na quantificação destes elementos nas infusões, e em particular para o Ca, o Ni e o Cd. Para o cobalto não foram realizados ensaios de recuperação.

Tendo em conta os limites legislados verificou-se que todas as amostras apresentaram concentrações preocupantes de Ni, bem como de Mn para as amostras 2 e 4 sem algas na sua constituição.

Todas as amostras contendo algas apresentaram teores de Ca, Mg e Na superiores aos das amostras sem algas na sua constituição. Para os restantes elementos não foi possível relacionar as concentrações com a composição das infusões, em particular a presença de algas. De referir que neste estudo o número de amostras utilizadas foi pouco significativo.

Os métodos desenvolvidos deveriam ser aplicados a um número significativo de amostras de forma a ser possível correlacionar o teor de metais com a composição das infusões, nomeadamente com a presença de algas. Atendendo às origens deste tipo de amostras e sua importância nutricional, é recomendável que

outros metais sejam avaliados, como por exemplo o ferro, zinco, silício, bário, mercúrio ou arsênio.

5 - Bibliografía

- [1] Martínez, AE, Muniz, FJS *et al*, 2002. Análisis elemental de algas por ICP-AES. *Schironia*, 1: 10 – 15.
- [2] Rupérez, P, 2002. Mineral content of edible marine seaweeds. *Food Chemistry*, 79: 23 – 26.
- [3] Malik, J, Szakova, J *et al*, 2008. Determination of certain micro and macroelements in plant stimulants and their infusions. *Food Chemistry*, 111: 520 – 525.
- [4] Gingras, D, Belivaue, R, 2006. Alimentos Contra o Cancro. *Guerra & Paz*, 240pp.
- [5] Karak, T, Bhagat, RM, 2010. Trace elements in tea leaves, made tea and tea infusion: A review. *Food Research International*, 43: 2234 – 2252.
- [6] Dufresne, CJ, Farnworth, ER, 2001. A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 12: 404 – 421.
- [7] Cao, Y, Cao, R, 1999. Angiogenesis inhibited by drinking tea. *International Weekly Journal of Science*, 398: 398 - 381
- [8] Lambert, JD, Sang, S *et al*, 2010. Anticancer and Anti-inflammatory Effects of Cysteine Metabolites of the Green Tea Polyphenol, (-)-Epigallocatechin-3-gallate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 10016 – 10019.
- [9] Anderson, RA, Polansky, MM, 2002. Tea Enhances Insulin Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 7182 – 7186.
- [10] Balentine, DA, Wiseman, SA *et al* 1997. The chemistry of tea flavonoids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37: 693 – 704.
- [11] Maron, DJ, Lu, GP *et al* 2003. Cholesterol-lowering effect of a theaflavin-enriched green tea extract: a randomized controlled trial. *Archives of internal Medicine*, 163: 1448 – 1453.
- [12] Weisburger, JH, 1997. Tea and health: a historical perspective. *Cancer Letters*, 114: 315 – 317.
- [13] Wilson, KC, Clifford, MN, 1992. *Tea: cultivation to consumption*. Chapman & Hall 769 pp.
- [14] Sharma, V, Rao, LJ, 2009. A thought on the biological activities of black tea. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49: 379 – 404.
- [15] Dufresne, C, Farnworth, E, 2000. Tea, Kombucha, and health: a review. *Food Research International*, 33: 409 – 421.

- [16] Reto, M, Figueira, ME *et al.* 2007. Chemical Composition of Green Tea (*Camellia sinesis*) Infusions Comercialized in Portugal. *Plant Foods for Human Nutrition*, 62: 139 – 144.
- [17] Graham, HN, 1992. Green tea composition and polyphenol chemistry. *Preventive Medicine*, 21: 334 – 384.
- [18] Lozak, A, Soltyk, K *et al.* 2002. Determination of selected trace elements in herbs and their infusions. *The Science of the Total Environment*, 289: 33 – 40.
- [19] Engelhardt, UH, 2010. Chemistry of tea. *Comprehensive Natural Products II* 3: 999 – 1032.
- [20] Yang, CS, Wang, X, 2010. Green tea and cancer prevention. *Nutrition and Cancer*, 62: 931 – 937.
- [21] Higdon, JV, Frei, B, 2003. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43: 89 – 143.
- [22] Yang, CS, Wang, X *et al.* 2009. Cancer prevention by tea: animal studies, molecular mechanisms and human relevance. *Nature Reviews Cancer*, 9: 429 – 439.
- [23] Kemasag, ART, 2009. Tea – midwife and nurse to capitalism. *Race & Class*, 51: 69 – 83.
- [24] Ibearagar, 2010. Agar-Agar poderoso espessante e gelificante natural. *Food Ingredientes Brasil*, 14: 49 – 50.
- [25] Roberts, DA, Alistar, GB *et al* 2006. Ecological consequences of copper contamination in macroalgae: effects on epifauna and associated herbivores. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25: 2470 – 2479.
- [26] Sawidis, T, Brown, MT *et al.* 2001. Trace metal concentrations in marine macroalgae from different biotopes in the Aegean Sea. *Environment International*, 27: 43 – 47.
- [27] Burtin, P, 2003. Nutritional value of seaweeds. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 2: 498 – 503.
- [28] Okada, A, Takagi, Y *et al* 1995. Trace element metabolism in parenteral and enteral nutrition. *Nutrition*, 11: 106 – 119.
- [29] Baird, C, 2006. *Chemistry in your life*. W. H. Freeman & Company 2^a Ed, 600 pp
- [30] Reis, MFCV, 1997. Determinação de oligoelementos de interesse nutricional e toxicológico com um sistema automatizado de INAA. Dissertação de Doutoramento em Química. Faculdade de Ciências. Universidade do Porto
- [31] Irina, BPN, Castro, N *et al* 2007. Efeitos no Homem e no ecossistema de alguns metais pesados: Alumínio, Mercúrio, Chumbo, Cádmiio, Arsénio, Crómio, Cobalto,

Cobre e Zinco. Trabalho em Ecologia Aplicada. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

[32] Lee, HS, Cho, YH *et al* 2006. Dietary exposure of the Korean population to arsenic, cadmium, lead and mercury. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 531 – 537.

[33] Ekmekcoğlu, C, 2000. Intestinal bioavailability of minerals and trace elements from milk and beverages in humans. *Molecular Nutrition & Food Nutrition*, 44: 390 – 397.

[34] Bernardier, CD, 1997. *Advanced Nutrition: Micronutrients*. CRC Press, 256pp.

[35] Wood, RJ, Zheng, JJ, 1997. High dietary calcium intakes reduce zinc absorption and balance in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 65: 1803 – 1809.

[36] Hallberg, L, Brune, M *et al* 2010. Calcium: effect of different amounts on non-heme and heme-iron absorption in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 53: 112 – 132.

[37] Restuccio, A, 1992. Fatal hyperkalemia from a salt substitute. *The American Journal of Emergency Medicine*. 10: 171 – 174.

[38] Ganong, WF, 1999. *Review of medical physiology*. Appleton & Lange, 851pp.

[39] World Health Organization. “Diet, Nutrition and prevention of chronic diseases.” Geneva 2003, <http://www.fao.org/docrep/005/ac911e/ac911e00.htm> (consultado a 16 de Setembro de 2010)

[40] Swanson, CA, 2003. Iron intake and regulation: implications for iron deficiency and iron overload. *Alcohol*, 30: 99 – 102.

[41] Zulani, T, Krajl, B *et al* 2005. Minerals and trace elements in food commonly consumed in Slovenia. *Italian Journal of Food Science*, 17: 155 – 166.

[42] Navarro, SSA, Rohan, TE, 2007. Trace elements and cancer risk: a review of the epidemiologic evidence. *Cancer Causes Control*, 18: 7 – 27.

[43] Williams, DM, 1998. Copper deficiency in Humans. *Seminars in Hematology*, 20: 118 – 146.

[44] Goldhaber, SB, 2003. Trace element risk assessment: essentiality vs. toxicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 38: 232 – 274.

[45] Shils, ME, Shike, M *et al* 2005. *Mother nutrition in health and disease*. Lippincott Williams & Wilkins, 2146pp.

[46] Karam, P, 1996. Mineral water and spas in France. *American Journal of Clinical Dermatology*, 14: 607 – 617.

[47] Barceloux, DG, 1999. Manganese. *Clinical Toxicology*, 37: 293 – 307.

[48] Budinger, L, Hertl, M, 2000. Immunologic mechanisms in hypersensitivity reactions to metal ions: an overview. *Allergy*, 55: 108 – 113.

- [49] Decreto- Lei nº 306/2007 de 27 de Agosto, Diário da República.
- [50] Borges, DLG, Curtius, AJ *et al* 2005. Fundamentos de espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua. Revista Analytica, 18: 58 – 67.
- [51] Welz, B, Becker-Ross, H *et al* 2003. High-Resolution Continuum-source Atomic Absorption Spectrometry – What Can We Expect?. Journal of Brazilian Chemical Society, 2: 220 – 229.
- [52] Analytic-Jena. <http://contra.analytik-jena.com> (acedido a 24 de Setembro de 2010)
- [53] Skoog, N, Holler, F, 1998. Princípios de análise instrumental. Bookman. 1024 pp
- [54] Raposo, LJ, Oliveira, SR *et al* 2008. Evaluation of alternate lines of Fe for sequential multi-element determination of Cu, Fe, Mn and Zn in soil extracts by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry. Analytica Chimica Acta, 627: 198 – 202.
- [55] Miller, JN, Miller, JC, 2000. Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry. Pearson Education, 233 pp.
- [56] ISO 8466-1:1990 (E) Water Quality – Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics – Part1: Statistical evaluation of the linear calibration.
- [57] ISO 8466-2:1993 (F) Qualité de l'eau – Étalonnage et évaluation des méthodes d'analyse et estimation des caracteres de performance – Partie 2: Stratégie d'étalonnage pour fonctions d'étalonnage non linéaires du second degree.
- [58] Danzer, K, 1998, Guidelines for Calibration in Analytical Chemistry, Part I – Fundamentals and single component calibration. International Union of Pure and Applied Chemistry. 70: 993 – 1014.
- [59] Apha, 1995. Standard Methods. American Public Health Association, 1325 pp.
- [60] Felisbela, R, Marina, N, 2007. Avaliação de metais pesados em produtos alimentares á base de extractos de algas. Trabalho para a disciplina de LBTA III, Instituto Superior de Engenharia do Porto, 36pp.
- [61] Excel-Solver 2007, Microsoft & Frontline Solvers
- [62] Loco, JV, Elskens, M *et al* 2002. Linearity of caibrations curves: use and misuse of the correlation coeficiente. Accreditation and Quality Assurance, 7: 281 – 285.

Anexo A – Curvas de Calibração do Cobalto

Da Tabela A.1 à Tabela A.5 são apresentados os valores para as restantes calibrações para o Co.

Tabela A.1 - Parâmetros experimentais para avaliação do método de regressão para traçado da segunda curva calibração do Co.

	Regressão		
	Linear	Linear Ponderada	Quadrática
a	0,0055	0,0054	-2,86E-04
b	6,97E-3	7,45E-03	9,73E-03
c	-	-	0,0027
R ²	0,9854	0,9580	0,9976
S _y	3,78E-03	3,55E-03	1,75E-03
S _{x0}	0,54	0,47	2,6E-2
V _{x0} (%)	10,6	9,3	5,1
SS _{res}	5,7E-05	9,8E-05	9,3E-06
DS ²	4,8E-05	4,1E-05	-
PG	15,6	13,4	-
F	34,1	34,1	-
LD (ppb)	1,6	1,4	0,20
LQ (ppb)	6,9	4,8	0,50

Tabela A.2 - Parâmetros experimentais para avaliação do método de regressão para traçado da terceira curva calibração do Co.

	Regressão		
	Linear	Linear Ponderada	Quadrática
a	0,0026	0,0012	-4,64E-05
b	1,12E-02	1,22E-02	1,24E-02
c	-	-	0,0021
R ²	0,9993	0,9987	0,9995
S _y	1,36E-03	1,28E-02	1,43E-03
S _{x0}	0,11	0,11	0,11
V _{x0} (%)	2,3	2,1	2,3
SS _{res}	7,4E-06	1,28E-05	6,1E-06
DS ²	1,26E-06	4,48E-07	-
PG	0,62	0,22	-
F	34,11	34,11	-
LD (ppb)	0,34	0,30	0,10
LQ (ppb)	5,3	1,1	0,50

Tabela A.3 - Parâmetros experimentais para avaliação do método de regressão para traçado da quarta curva calibração do Co.

	Regressão		
	Linear	Linear Ponderada	Quadrática
a	0,0040	0,0028	1,69E-04
b	7,98E-03	8,34E-03	9,61E-03
c	-	-	0,0024
R ²	0,9961	0,9934	0,9994
S _y	2,21E-03	1,80E-03	9,80E-04
S _{x0}	0,28	0,22	0,12
V _{x0} (%)	5,4	4,2	2,4
SS _{res}	2,0E-05	3,0E-05	2,9E-06
DS ²	1,67E-05	1,01E-05	-
PG	17,48	10,5	-
F	34,1	34,1	-
LD (ppb)	0,80	0,60	0,10
LQ (ppb)	5,5	2,2	0,30

Tabela A.4 - Parâmetros experimentais para avaliação do método de regressão para traçado da quinta curva calibração do Co.

	Regressão		
	Linear	Linear Ponderada	Quadrática
a	0,0044	0,0011	-1,69E-04
b	1,01E-02	1,11E-02	1,18E-02
c	-	-	0,0028
R ²	0,9960	0,7837	0,9981
S _y	2,85E-03	2,51E-03	2,28E-03
S _{x0}	0,28	0,23	0,23
V _{x0} (%)	5,5	4,4	4,5
SS _{res}	3,2E-05	1,11E-04	1,6E-05
DS ²	1,68E-05	9,53E-06	-
PG	3,22	1,83	-
F	34,1	34,1	-
LD (ppb)	0,80	0,70	0,20
LQ (ppb)	6,4	2,3	0,60

Tabela A.5 - Parâmetros experimentais para avaliação do método de regressão para traçado da sexta curva calibração do Co.

	Regressão		
	Linear	Linear Ponderada	Quadrática
a	0,0020	0,0013	-1,04E-04
b	1,24E-02	1,24E-02	1,34E-02
c	-	-	0,0010
R ²	0,9982	0,9928	0,9987
S _y	2,34E-03	9,55E-04	2,28E-03
S _{x0}	0,19	7,7E-02	0,19
V _{x0} (%)	3,7	1,5	3,6
SS _{res}	2,2E-05	2,5E-05	1,6E-05
DS ²	6,32E-06	-1,20E-05	-
PG	1,21	2,30	-
F	34,1	34,1	-
LD (ppb)	0,60	0,20	0,30
LQ (ppb)	1,8	0,70	1,0

Anexo B – Curvas de calibração do Crómio

Da Tabela B.1 à Tabela B.5 são apresentados os valores para as restantes calibrações para o Cr.

Tabela B.1 - Parâmetros experimentais para avaliação do método de regressão para traçado da segunda curva calibração do Cr.

	Regressão		
	Linear	Linear Ponderada	Quadrática
a	0,0240	0,0250	-1,79E-04
b	2,63E-02	7,75E-03	2,70E-02
c	-	-	0,019
R ²	0,9956	0,0014	0,9973
S _y	1,39E-02	3,17E-03	1,26E-02
S _{x0}	0,59	0,13	0,54
V _{x0} (%)	5,8	1,25	5,3
SS _{res}	7,7E-04	1,6E-03	4,74E-04
DS ²	3,01E-04	-4,34E-04	-
PG	1,91	2,57	-
F	34,1	34,1	-
LD (ppb)	1,8	0,38	0,10
LQ (ppb)	5,3	1,28	0,40

Tabela B.2 - Parâmetros experimentais para avaliação do método de regressão para traçado da terceira curva calibração do Cr.

	Regressão		
	Linear	Linear Ponderada	Quadrática
a	0,0120	0,0130	-3,05E-04
b	3,20E-02	2,55E-02	1,79E-02
c	-	-	0,021
R ²	0,9779	0,2256	0,9965
S _y	1,61E-02	1,44E-02	7,37E-03
S _{x0}	1,34	1,14	0,63
V _{x0} (%)	13,1	9,1	6,2
SS _{res}	1,0E-03	1,2E-03	1,63E-04
DS ²	8,70E-04	6,62E-04	-
PG	16,0	12,2	-
F	34,1	34,1	-
LD (ppb)	4,0	3,4	0,06
LQ (ppb)	4,9	11,3	0,20

Tabela B.3 - Parâmetros experimentais para avaliação do método de regressão para traçado da quarta curva calibração do Cr.

	Regressão		
	Linear	Linear Ponderada	Quadrática
a	0,0053	0,0160	-1,06E-05
b	1,60E-02	4,59E-03	1,62E-02
c	-	-	0,0049
R ²	0,9996	0,9442	0,9997
S _y	2,62E-03	3,93E-03	2,16E-03
S _{x0}	0,16	0,25	0,12
V _{x0} (%)	1,60	2,4	0,82
SS _{res}	2,7E-05	3,2E-05	2,6E-05
DS ²	1,06E-06	3,55E-05	-
PG	0,12	4,05	-
F	34,1	34,1	-
LD (ppb)	0,50	0,70	0,090
LQ (ppb)	4,9	2,5	0,30

Tabela B.4 - Parâmetros experimentais para avaliação do método de regressão para traçado da quinta curva calibração do Cr.

	Regressão		
	Linear	Linear Ponderada	Quadrática
a	0,0072	0,0072	-7,44E-05
b	1,62E-02	1,61E-02	1,76E-02
c	-	-	0,0041
R ²	0,9991	0,9897	0,9997
S _y	4,36E-03	4,17E-03	2,48E-03
S _{x0}	0,27	0,26	0,18
V _{x0} (%)	2,64	2,5	1,7
SS _{res}	7,6E-05	7,7E-05	2,4E-05
DS ²	5,19E-05	4,53E-05	-
PG	6,44	5,63	-
F	34,11	34,11	-
LD (ppb)	0,80	0,80	0,10
LQ (ppb)	6,2	2,6	0,30

Tabela B.5 - Parâmetros experimentais para avaliação do método de regressão para traçado da sexta curva calibração do Cr.

	Regressão		
	Linear	Linear Ponderada	Quadrática
a	0,00010	0,00059	4,76E-05
b	1,70E-03	1,68E-03	7,85E-04
c	-	-	0,0019
R ²	0,9770	0,9808	0,9995
S _y	2,33E-03	2,30E-03	3,88E-04
S _{x0}	1,37	1,37	0,22
V _{x0} (%)	13,4	13,4	2,17
SS _{res}	2,2E-05	2,2E-05	4,5E-07
DS ²	2,15E-05	2,08E-05	-
PG	141	138	-
F	34,11	34,11	-
LD (ppb)	4,1	4,1	0,03
LQ (ppb)	13,7	13,7	0,1

Anexo C – Curvas de calibração do Cobre

Da Tabela C.1 à Tabela C.2 são apresentados os valores para as restantes calibrações para o Cu.

Tabela C.1 - Parâmetros experimentais para avaliação do método de regressão para traçado da segunda curva calibração do Cu.

	Regressão		
	Linear	Linear Ponderada	Quadrática
a	0,0250	0,0220	-1,38E-04
b	9,11E-03	9,78E-03	1,05E-02
c	-	-	0,023
R ²	0,9957	0,6581	0,9973
S _y	2,62E-03	2,46E-03	2,37E-03
S _{x0}	0,29	0,21	0,26
V _{x0} (%)	5,5	4,8	5,0
SS _{res}	2,7E-05	6,1E-05	1,68E-05
DS ²	1,1E-05	7,26E-06	-
PG	1,88	1,29	-
F	34,1	34,1	-
LD (ppb)	0,90	0,70	0,03
LQ (ppb)	1,1	2,5	0,1

Tabela C.2 - Parâmetros experimentais para avaliação do método de regressão para traçado da terceira curva calibração do Cu.

	Regressão		
	Linear	Linear Ponderada	Quadrática
a	0,0021	0,0028	6,39E-05
b	2,61E-03	2,25E-03	1,98E-03
c	-	-	0,0028
R ²	0,9799	0,9809	0,9942
S _y	1,63E-03	1,07E-03	1,67E-03
S _{x0}	6,2E-04	0,48	0,63
V _{x0} (%)	12,0	9,2	12,0
SS _{res}	1,1E-05	2,4E-05	8,33E-06
DS ²	2,3E-06	-3,72E-06	-
PG	0,82	1,34	-
F	34,11	34,11	-
LD (ppb)	1,9	1,4	0,2
LQ (ppb)	7,7	4,8	0,6

Anexo D – Curvas de calibração do Níquel

Na Tabela D.1 são apresentados os valores para segunda calibração para o Ni.

Tabela D.1 - Parâmetros experimentais para avaliação do método de regressão para traçado da segunda curva calibração do Ni.

	Regressão		
	Linear	Linear Ponderada	Quadrática
a	0,0260	0,0280	-3,42E-05
b	4,26E-03	4,20E03	5,25E-03
c	-	-	0,023
R ²	0,9931	0,9830	0,9973
S _y	4,75E-03	2,11E-03	3,40E-03
S _{x0}	1,11	0,50	0,81
V _{x0} (%)	7,3	3,2	5,2
SS _{res}	9,0E-05	1,1E-04	3,46E-05
DS ²	5,5E-05	1,7E-05	-
PG	4,81	1,46	-
F	34,1	34,1	-
LD (ppb)	3,3	1,5	0,02
LQ (ppb)	11,1	5,0	0,06