



Universidade da Beira Interior

Departamento de Química

Determinação de Iodo e de Metais Pesados em Vegetais Bociogénicos

Rita Margarida Pessoa

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em **Bioquímica**

(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Professora Doutora Ana Paula Costa

Coorientadora: Professora Doutora Albertina Marques

Covilhã, junho de 2012

“Por caminho não quero significar um caminhar ao acaso, sem finalidade, mas antes um trajeto agradável com um objetivo definido, ao mesmo tempo que há a consciência das dificuldades e perigos que podem deparar-se-nos no percurso”.

“Creio que fomos colocados neste mundo de beleza e maravilhas com a faculdade especial de as apreciar, nalguns casos de termos o prazer de colaborar no seu desenvolvimento, e também de podermos auxiliar os outros, em vez de os excedermos, e por todos estes meios, ter gosto na vida – isto é, ser feliz”.

Baden Powell

Agradecimentos

Em termos pessoais, tão importante como os resultados conseguidos com o presente estudo é o percurso global desde o início até ao seu final. Nesta longa caminhada não estive só. É pois justo que, ao finalizar, lembre algumas pessoas que pela sua cumplicidade, apoio, e estímulo, me ajudaram a concretizar os meus objetivos.

À Professora Doutora Ana Paula Costa, orientadora científica deste projeto, pela sua orientação, apoio, amizade e disponibilidade depositada na orientação...

À Professora Doutora Albertina Marques, pela sua coorientação, por me ter dado a oportunidade de desenvolver o presente trabalho e pela disponibilidade demonstrada ao longo deste percurso...

À Professora Doutora Maria José Pacheco, pela cooperação na utilização do aparelho de espectroscopia de absorção atómica...

Aos meus colegas de laboratório Ângelo Luís e Sónia Sousa pelo apoio demonstrado ao longo do trabalho...

Aos meus Pais e Irmã, quando o percurso se tornou difícil, estiveram sempre do meu lado para me apoiar. Quando desanimei, deram-me coragem para não desistir. Nos bons momentos, riram-se comigo e partilharam a minha alegria. Nos maus momentos, choraram comigo e deram-me força... são e serão tudo para mim...

Para todos, um muito sentido, Obrigada.

Resumo

O iodo é essencial para a formação de tirosina e triiodotironina, comumente denominada de T4 e T3, duas hormonas essenciais para a manutenção do metabolismo em todas as células. O iodo é um elemento mineral cuja deficiência leva a uma anomalia clínica, aumento da glândula da tiróide, denominado bócio.

Existem metais pesados que também influenciam o metabolismo e consequentemente o funcionamento regular da tiróide, tais como, selénio, manganês, zinco e cobre.

Para além destes minerais, a presença de substâncias bociogénicas em vegetais, interferem também com a síntese, processamento e libertação de hormonas tiroideias, o que implica um aumento da tiróide.

Este trabalho teve como objetivo determinar o teor de iodo e dos metais pesados, cobre, manganês, selénio e zinco, em amostras vegetais pertencentes à espécie vegetal, *Brassicaceae Napus*, de nome vulgar nabo, provenientes das zonas litoral e interior de Portugal, pelo método de Sandell-Kolthoff e por espectrofotometria de absorção atómica, respetivamente.

A reação de Sandell-Kolthoff é utilizada com frequência, para determinar iodo em concentrações relativamente baixas. Foram, contudo, feitas pequenas alterações ao método com o objetivo de o otimizar e para tal procedeu-se à validação interna do mesmo.

Na determinação de iodo, foi possível detetar e quantificar iodo nas amostras em estudo, cuja concentração obtida corresponde a 0,053 mg/L, sendo igual nas amostras provenientes do litoral e interior.

Verificou-se que o teor de cobre é superior nas amostras vegetais provenientes do litoral enquanto o manganês e zinco é superior nas amostras vegetais provenientes do interior.

Com este trabalho pretendeu-se contribuir para o estudo de minerais que provocam patologias ao nível da tiróide.

Palavras-Chave: Tiróide, Iodo, Selénio, Manganês, Zinco, Cobre, Vegetais Bociogénicos, Reação de Sandell-Kolthoff, Espectroscopia de Absorção Atómica.

Abstract

Iodine is essential for the formation of tyrosine and triiodothyronine, commonly known as T4 and T3, two hormones essential for the maintenance of the metabolism of all cells. Iodine is a mineral element whose deficiency leads to a clinical disorder, an increase of the thyroid gland, called goiter.

Heavy metals also influence the metabolism and thus the regular operation of the thyroid, such as copper, manganese, selenium and zinc. In addition to these minerals, the presence of substances goitrogenic in plants, also interfere with the synthesis, processing and release of thyroid hormones, which implies an increase of thyroid.

This study aimed to determine the iodine content and heavy metals, selenium, manganese, zinc and copper in plant samples belonging to plant species, *Brassicaceae Napus*, common name for turnip, from the coastal and interior areas of Portugal, by the method the Sandell-Kolthoff and by atomic absorption spectroscopy, respectively.

The reaction Sandell-Kolthoff is often used to determine iodine in relatively low concentrations. However, they were made small changes to the method in order to optimize the procedure to such an internal validation of the same.

In the determination of iodine was possible to detect and quantify iodine in the samples under study, in concentrations obtained corresponds to 0,053 mg/L, being the same for samples from the coastal and interior.

It was found that the copper content is higher in plant from the shore while the manganese and zinc is higher in plant tissue from the inside.

This work aims to contribute to the study of minerals that cause the level of thyroid diseases.

Keywords: Thyroid, Iodine, Selenium, Manganese, Zinc, Copper, Goitrogenic plants, Sandell-Kolthoff reaction, Atomic Absorption Spectroscopy.

Índice

Capítulo 1 – Introdução	1
Capítulo 2 – Fundamentos Teóricos	4
2.1 – Tiróide	5
2.2 – Hormonas da Tiróide	6
2.2.1 – Síntese de T3 e T4	6
2.2.2 – Regulação da secreção de T3 e T4	9
2.2.3 – Transporte das hormonas tiroideias	10
2.2.4 – Ativação hormonal	11
2.2.5 – Funções das hormonas tiroideias	11
2.2.6 – Ações das hormonas da tiróide	13
2.2.7 – Distúrbios da Tiróide	14
2.3 – Bócio	15
2.4 – Substâncias Bociogénicas	18
2.5 – Minerais	19
2.6 – Descrição dos minerais em estudo	21
2.6.1 – Iodo	21
2.6.2 – Selénio	22
2.6.3 – Manganês	26
2.6.4 – Zinco	29
2.6.5 – Cobre	30
Capítulo 3 – Fundamentos Práticos	32
3.1 – Amostras	33
3.2 – Método da Determinação do Iodo	33
3.3 - Validação do Método da Determinação do Iodo	35
3.3.1 – Especificidade / Seletividade	36
3.3.2 – Gama de trabalho	37
3.3.3 – Linearidade	38
3.3.4 – Sensibilidade	40
3.3.5 – Limiares Analíticos do método de ensaio	40
3.3.6 – Precisão	41
3.3.7 – Exatidão	43
3.3.8 – Robustez	44
3.4 - Procedimento da Determinação do Iodo	45
3.5 - Método da Extração Sequencial	46
3.6 - Procedimento da Extração Sequencial	47
3.7 - Método da Espectroscopia de Absorção Atómica	47
3.7.1 - Atomização	47
3.7.2 - Mecanismo de Absorção	48
3.7.3 - Lei de Lambert-Beer	49
3.7.4 - Aparelhagem	49
3.7.5 - Fontes para absorção atómica	50
3.7.6 – Tipos de chama utilizados em absorção atómica	51
3.7.7– Sistema de atomização	52
3.7.8 – Queimador	52
3.7.9 – Aplicações em análises quantitativas	53
3.7.10 – Avaliação do método	54
3.8 - Procedimento da Espectroscopia de Absorção Atómica	56
3.9 - Esquema do Procedimento Experimental	57
Capítulo 4 – Resultados e Discussão	58

4.1 – Determinação do iodo	59
4.2 – Validação do Método da Determinação do Iodo	63
4.2.1 – Especificidade / Seletividade	63
4.2.2 – Gama de trabalho	64
4.2.3 – Linearidade	65
4.2.4 – Sensibilidade	67
4.2.5 – Limiares analíticos do método de ensaio	68
4.2.6 – Precisão	68
4.3 - Extração Sequencial	70
4.4 - Espectroscopia de Absorção Atômica	71
Capítulo 5 – Conclusão e Perspetivas Futuras	74
Bibliografia	78
Anexos	85

Capítulo 1 - Introdução

Capítulo 1 – Introdução

A tiróide é uma glândula de secreção endócrina, isto é, produz hormonas tiroideias na circulação sanguínea. A tiróide produz e liberta para a circulação sanguínea; triiodotironina e tiroxina. As hormonas tiroideias são essenciais à vida e exercem vários efeitos a nível do metabolismo, crescimento e desenvolvimento do organismo. Contribuem para a regulação da temperatura corporal, da frequência cardíaca, pressão arterial, entre outras funções.

As doenças da tiróide surgem quando existe excesso destas hormonas provocando hipertiroidismo e no caso de deficiência provocam hipotiroidismo, que se manifesta por um aumento de volume da própria glândula dando origem àquilo que vulgarmente se designa por bócio.

Normalmente as patologias da tiróide estão associadas à carência de iodo, esta leva a uma diminuição da produção hormonal da tiróide. O iodo é o principal requisito para a síntese da hormona da tiróide e respetiva regulação. No entanto existem metais que direta ou indiretamente interferem na síntese e metabolismo da tiróide.

Para além do iodo e metais que influenciam o correto funcionamento da tiróide existem substâncias bociogénicas que causam dificuldades para a tiróide em produzir as suas hormonas. Estas substâncias contêm na sua constituição isotiocianatos, que têm sido relacionados com a redução da função da tiróide. Exemplos destas substâncias são os vegetais crucíferos.

Assim sendo este trabalho teve como objetivos gerais, determinar iodo e metais pesados em vegetais bociogénicos.

Sendo os objetivos específicos do trabalho, uma pesquisa inicial para averiguar quais os metais que interferem no metabolismo da tiróide, bem como as amostras vegetais bociogénicas a analisar e as técnicas experimentais a utilizar no trabalho.

Após ter sido efetuada a pesquisa bibliográfica adequada e de acordo com as disponibilidades laboratoriais, os metais selecionados para o estudo foram o cobre, manganês, selénio e zinco. E as amostras analisadas pertencem à espécie *Brassicaceae Napus* (nabo), na qual foi feita uma comparação de amostras provenientes do litoral (Leiria) e do interior (Covilhã) de Portugal. A metodologia experimental consistiu na quantificação do iodo pelo método de Sandell-Kolthoff e na extração sequencial da amostra para posterior determinação dos metais por espectroscopia de absorção atómica.

No capítulo 2 do presente trabalho apresentam-se os fundamentos teóricos relevantes, sobre os mecanismos de síntese, funcionamento e patologias associadas à tiróide e ainda uma breve descrição de substâncias consideradas bociogénicas, bem como dos minerais em estudo.

O capítulo 3 refere os fundamentos práticos, desde a referência das amostras utilizadas, e o seu tratamento, bem como a descrição dos métodos experimentais utilizados; determinação do iodo, extração sequencial, e espectroscopia de absorção atómica e os seus respetivos procedimentos. São também referidos os parâmetros necessários à validação de métodos.

No capítulo 4, apresentam-se os resultados do estudo efetuado relativo à validação direta do método da determinação do iodo e espectroscopia de absorção atómica.

E por último no capítulo 5, são apresentadas as conclusões finais e perspetivas futuras.

Em anexos, são apresentados alguns dados dos reagentes utilizados neste trabalho, devido à elevada toxicidade de alguns, é apresentada a lista de riscos e segurança. Bem como todos os cálculos das soluções preparadas neste trabalho.

Capítulo 2 – Fundamentos Teóricos

Capítulo 2 – Fundamentos Teóricos

2.1 – Tiróide

No nosso organismo existem diversos órgãos especializados na síntese e secreção de hormonas, denominados glândulas, tal como, glândula tiroideia ou tiróide.

As hormonas podem ser classificadas em grupos, de acordo com a sua estrutura química: as aminas são derivadas dos aminoácidos, em geral da tirosina e são produzidas pela tiróide e pela medula das suprarrenais e noutros órgãos que não são glândulas endócrinas; como exemplo, as hormonas tiroideias e a adrenalina.

As hormonas tiroideias são lipossolúveis, atravessam as membranas facilmente e ligam-se a recetores intracelulares. A composição química das hormonas influencia a forma como elas são transportadas na circulação sanguínea. Estas hormonas são muito hidrofóbicas e necessitam da união a uma proteína para não ficarem depositadas nas paredes vasculares.

As hormonas da tiróide, T3 e T4 são um exemplo de moléculas que se ligam a um recetor intracelular, estes recetores são macromoléculas que se encontram no citosol ou em membranas intracelulares onde se ligam moléculas sinalizadoras que, devido à sua composição química, atravessam a membrana da célula alvo. Quando estes recetores são ativados podem ligar-se a uma sequência de ADN do núcleo e controlar a transcrição de diversos genes. Os recetores desta hormona existem em vários órgãos vitais, dando lugar a efeitos muito diversos dependendo do tecido alvo. Em geral, a sua ativação induz uma aceleração do metabolismo:

- Aumento no consumo de oxigénio devido a um efeito nos pulmões.
- Aumento na produção de calor, devido a uma estimulação das vias catabólicas no músculo, fígado e tecido adiposo.
- Aumento da transpiração devido ao efeito anterior.
- Aumento da frequência cardíaca.
- Aumento do apetite.

A glândula tiroideia localiza-se no pescoço, muito próxima da traqueia. Tem a forma aproximada de uma borboleta, com dois lobos laterais unidos por um istmo.

Macroscopicamente, podem-se observar pequenos nódulos mais ou menos salientes na sua superfície que correspondem aos folículos produtores de tiroglobulina, uma forma de armazenar as hormonas tiroideias (fig. 2.1). Intimamente ligadas à tiróide, encontram-se as glândulas paratiroides.

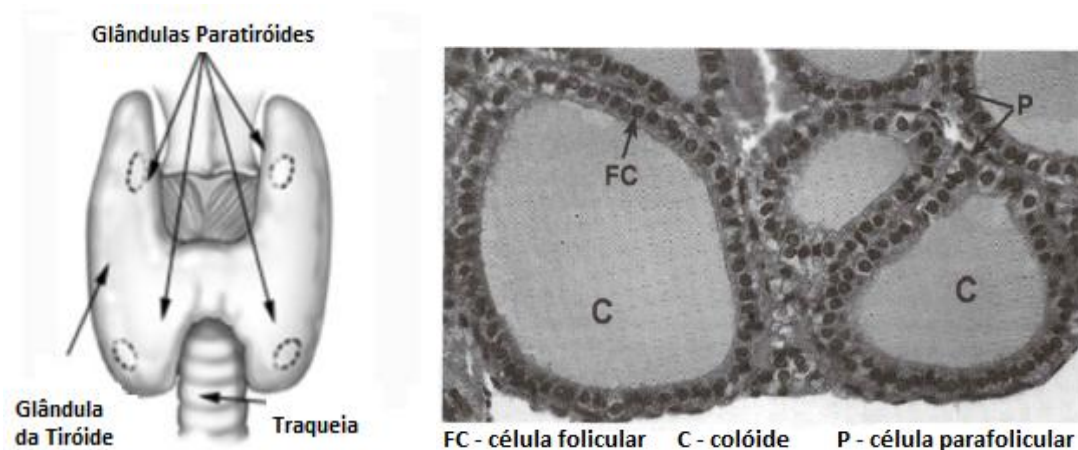


Figura 2.1 – Representação macroscópica da tiróide [1].

A tiróide é um órgão ricamente irrigado. A artéria tiroideia superior parte da carótida externa, a artéria tiroideia inferior procede do tronco tirocervical da subclavia e a pequena tiroideia imã, da artéria braquicefálica na crossa da aorta. A drenagem venosa faz-se através de múltiplas veias superficiais que formam as veias tiroideias superior, lateral e inferior.

Adjacentes à tiróide existem quatro glândulas paratiroides, de aproximadamente 40 g cada uma. A sua localização em relação à tiróide pode ser variável, e inclusivamente algumas pessoas têm uma quinta glândula paratiroide (12% das pessoas aproximadamente) [1,2].

2.2 – Hormonas da Tiróide

2.2.1 - Síntese de T3 e T4

Um elemento fundamental para a síntese de hormonas da tiróide é o iodo. A ingestão diária de iodo varia entre 70 e 200 µg. O iodo é absorvido para o sangue ao nível do duodeno e encontra-se nos fluidos extracelulares tais como na saliva, nas secreções gástricas e nas glândulas mamárias. Na tiróide existe um transporte ativo do iodeto (I^-) desde o plasma até à membrana basal das células foliculares.

A TSH (glicoproteína de duas cadeias polipeptídicas que regula o crescimento e o metabolismo da glândula da tiróide) estimula a transcrição do gene da tiroglobulina que codifica o monómero de pretiroglobulina cujas cadeias são glicosiladas durante o transporte para o aparelho de Golgi. Os dímeros de tiroglobulina são incorporados a vesículas que se fundem com a membrana basal e são libertadas para o lúmen dos folículos.

No lúmen das células foliculares tiroideias o iodeto (I^-) sofre oxidação pela enzima tiroperoxidase com a ajuda de H_2O_2 e, associa-se aos resíduos de tirosina da tiroglobulina e forma monoiodotirosina (MIT) e diiodotirosina (DIT) (fig. 2.2).

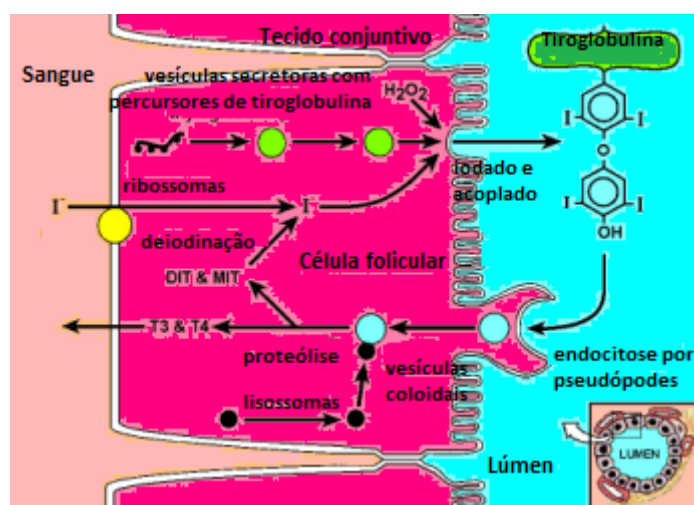


Figura 2.2 – Síntese de hormonas da tiróide [1].

A enzima tiroperoxidase catalisa a combinação entre moléculas de MIT e DIT para formar a tetraiodotironina (T4) e a triiodotironina (T3). As T3 e T4 são armazenadas no folículo como componentes da tiroglobulina, onde esta passa do folículo para o interior das células tiroideias por endocitose, dando origem a vesículas que no citoplasma se fundem com os lisossomas. Enzimas proteolíticas dos lisossomas atuam sobre a tiroglobulina para libertar a T3 e T4 que, como são lipossolúveis, difundem-se para os espaços intersticiais e finalmente para o interior dos capilares sanguíneos.

A figura 2.3 representa de forma sucinta a formação das moléculas de monoiodotirosina, diiodotirosina, triiodotirosina e tetraiodotirosina.

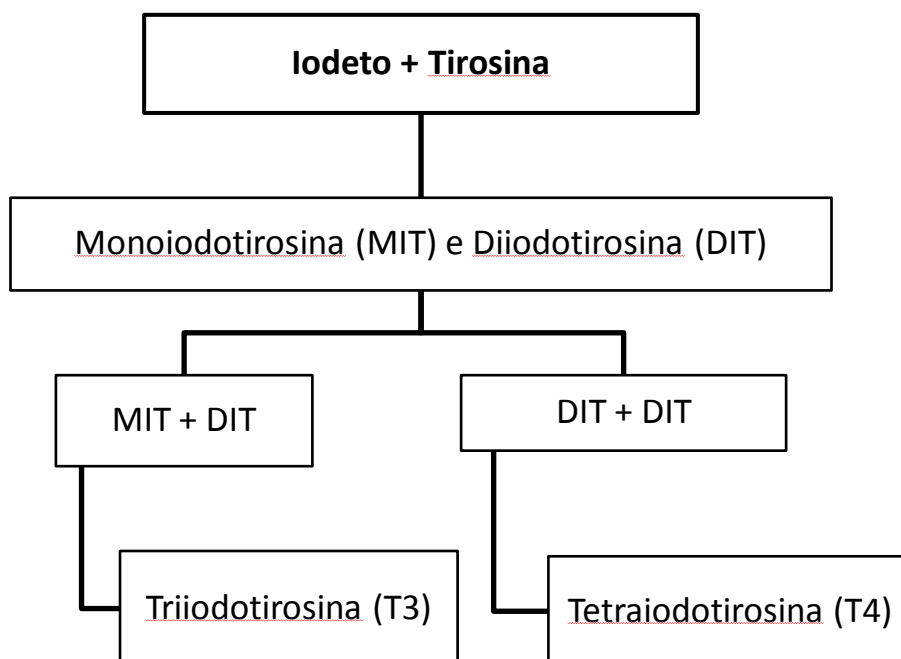


Figura 2.3 – Representação da formação de T3 e T4.

No sangue, as T3 e T4 são transportadas em combinação com proteínas plasmáticas, tais como a globulina transportadora da tiroxina (TBG) e a pré-albumina que se liga à tiroxina (transtiretina, TBPA). Apenas pequenas quantidades (0,04% de T4 e 0,4% de T3) circulam livres, sendo esta pequena fração livre a responsável pela atividade hormonal.

A T4 é convertida em T3 nos tecidos do organismo (nos rins por ação da enzima 5' monodesiodase, mas também pode ocorrer no fígado, através 3' monodesiodase, formando T3 reverso cuja função biológica é desconhecida). Esta conversão pode ser importante na ação destas hormonas, pois a T3 é a principal hormona a interagir com a célula alvo, ao que acresce o facto de a T3 ser várias vezes mais potente que a T4 (fig. 2.4) [1-3].

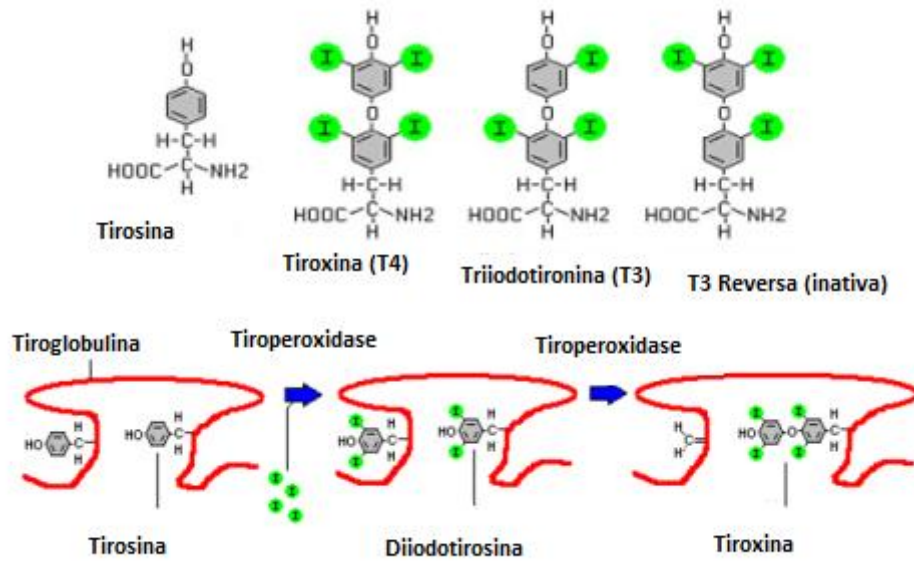


Figura 2.4 – Estrutura das moléculas de tirosina e seus derivados [1].

2.2.2 - Regulação da secreção da T3 e T4

O controlo da função da tiróide é feito principalmente pelo hipotálamo, através da somatostatina e da TRH (hormona libertadora de tirotrófina), e pela hipófise anterior, através da TSH (hormona estimulante da tiróide). Concretamente, a TRH estimula a produção de TSH, enquanto a somatostatina tem o efeito contrário, inibe a produção de TSH. Esta última estimula a transformação de tiroglobulina nas hormonas tiroideias triiodotironina (T3) e tirosina ou tetraiodotironina (T4) (fig. 2.5).

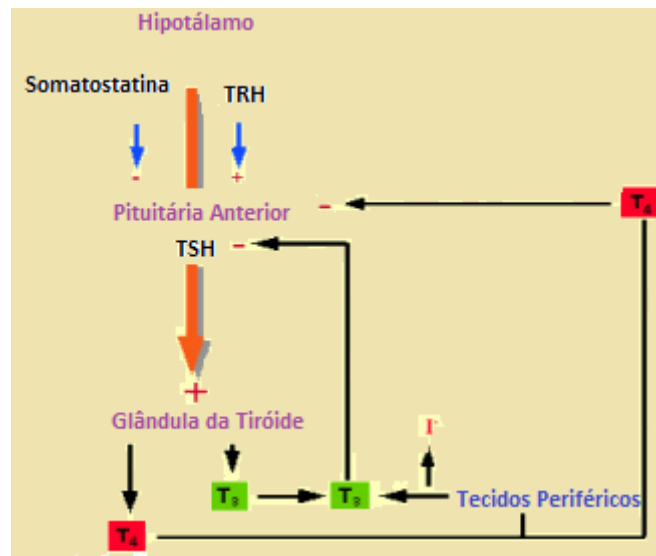


Figura 2.5 – Regulação da secreção da T3 e T4 [1].

A regulação da secreção hormonal faz-se por feedback negativo das T3 e T4 sobre a adeno-hipófise e o hipotálamo. Uma concentração elevada destas hormonas inibe a produção de TRH pelo hipotálamo e de TSH pela adeno-hipófise, levando a célula folicular da tiróide a reduzir a captação de iodo e a libertação de vesículas de tiroglobulina. Com isso ocorre uma diminuição da produção de secreção de T3 e de T4.

As hormonas tiroideias difundem-se através da membrana celular para o citoplasma. Uma vez no interior da célula, ligam-se a recetores nucleares, intervindo na transcrição genética e síntese proteica. Podem também ligar-se às mitocôndrias e alterar a sua função, do que resulta uma maior taxa de produção de calor. As hormonas tiroideias afetam quase todos os tecidos, com efeitos sobre o metabolismo, o crescimento e diferenciação celular.

Quando a dieta de um indivíduo é pobre em iodo, desenvolve-se um aumento da tiróide, ou bócio [1,2].

2.2.3 - Transporte das hormonas tiroideias

As hormonas tiroideias, assim como os esteroides, são transportados no sangue através de proteínas específicas, como por exemplo, a globulina transportadora de tiroxina ou TBG. Esta característica limita a sua difusão através dos tecidos, ao mesmo tempo em que os protege da degradação enzimática.

As hormonas devem estar na forma livre para poder entrar nas células alvo, havendo portanto, um equilíbrio entre a forma unida e a forma livre.

Além da TBG, T3 e T4 são conjugadas no sangue em menor grau à pré-albumina e à albumina. A forma livre, biologicamente ativa, representa 0,5% das hormonas tiroideias na circulação. No plasma sanguíneo são encontrados entre 1 e 1,5 ng/dl de globulina de ligação para a T4.

A TBG capta 75% da T4 secretada, sendo estimulada pelos esteroides sexuais e inibida por salicilatos. A afinidade da T3 pela TBG é menor, o que lhe permite maior facilidade de difusão aos tecidos. Cerca de 15% da T4 une-se à pré-albumina, que não transporta T3. Metade da T4 circulante é libertada para os tecidos em 6 dias, e metade da T3 é libertada num só dia.

A união das hormonas tiroideias às proteínas diminui na libertação pelos rins e aumenta o tempo de meia-vida na circulação, sendo um reservatório importante destas hormonas. Mas, as proteínas por outro lado, têm um papel regulador nos níveis hormonais funcionais [4].

2.2.4 - Ativação hormonal

A transformação da T4 em T3, forma biologicamente ativa das hormonas tiroideias, ocorre pela ação de uma enzima peroxidase específica, que possui selénio na sua estrutura, e é encontrada no fígado, rins e órgãos alvo. Este facto indica que uma deficiência em selénio, também pode conduzir a distúrbios relacionados às hormonas da tiróide. A potência da T3 é de 3-4 vezes maior que a T4, sendo os seus efeitos metabólicos mais rápidos. A T3 é também, o principal metabolito que controla a secreção da TSH. O tempo de meia-vida da T4 é de 7 dias e o da T3 é de 2 dias, o que explica a relação T4/T3 no plasma de 20 ou mais dias.

A inativação das iodotirosinas ocorre por deiodinação, por conjugação com glicuronato ou sulfato, ou por oxidação, no fígado, e em menor grau, nos rins. A deiodinação da T4, nos órgãos alvo ocorre na posição 5, pela enzima 5' deiodinase. Este mecanismo pode servir para atenuar os efeitos metabólicos das hormonas tiroideias, na subnutrição, doença febril, dano hepático ou renal e em recém-nascidos. Dependendo da necessidade, a T4 deiodinada pode formar T3 reversa (inativa).

Os recetores nucleares nas células alvo têm maior capacidade de ligação a T3 que T4. Uma vez, formado o complexo hormona-recetor, há um estímulo para a enzima RNA polimerase DNA-dependente, aumentar a síntese de mRNA e de proteínas, que na sua maioria são enzimas específicas envolvidas com o metabolismo orgânico [4].

2.2.5 - Funções das hormonas tiroideias

As principais funções das hormonas tiroideias T3 e T4 estão relacionadas com a regulação da taxa metabólica e produção de calor. As hormonas atuam através de recetores proteicos específicos, presentes unicamente nas células alvo em uniões de alta especificidade e afinidade. Existem estruturas análogas que se unem ao recetor ocasionando efeitos iguais aos da hormona, denominados de agonistas. Quando estas estruturas atuam no bloqueio do efeito hormonal, são denominadas antagonistas.

As hormonas tiroideias, assim como os esteroides, podem atravessar a membrana plasmática das células por difusão simples, por serem lipofílicas, indo ao encontro dos recetores no núcleo, onde alteram a transcrição de genes específicos, o que requer tempo para a síntese de mRNA e proteínas no núcleo. Este tempo que pode ser de horas ou dias, é longo, comparando com os efeitos das hormonas peptídicas, por exemplo, que são de segundos ou minutos.

Os recetores nucleares têm domínios que interatuam com elementos da transcrição, afetando a velocidade da ação hormonal. Os recetores proteicos possuem uma estrutura chamada “dedo de zinco”, onde se ligam dois iões zinco, estabilizando a ligação ao ADN.

A ideia das hormonas tiroideias aumentarem o consumo de oxigénio e a produção de calor por desacoplamento da fosforilação oxidativa na mitocôndria, apresenta algumas evidências em contrário. Primeiro, porque outros desacopladores como o 2,4 - dinitrofenol, carecem das ações fisiológicas das hormonas tiroideias; em segundo lugar, os inibidores da síntese proteica como a puromicina inibem a ação de produção de calor das hormonas tiroideias, o que sugere que esta ação é mediada por enzimas; e finalmente, pelo facto de o efeito desacoplador só ser observado em altas concentrações, não fisiológicas, de hormonas tiroideias *in vitro*. Estas hormonas incrementam a utilização de glicose pelas células, melhorando a sua absorção desde o lúmen intestinal e provocando um aumento de glicemia. No hipertiroidismo, a hiperglicemia decorrente provoca hipersecreção de insulina, levando a um esgotamento das células beta do pâncreas e posterior diabetes. Na diabetes, as hormonas tiroideias agravam a situação, não somente por elevar a absorção de glicose, mas porque incrementam a glicogénese no fígado.

A síntese proteica também é estimulada pelas hormonas tiroideias. Porém, em quantidades excessivas elas podem inibi-la provocando aumento do catabolismo proteico e aumento da excreção de azoto na urina. No hipotiroidismo ocorre efeito anabolizante, particularmente sobre as proteínas plasmáticas, com efeito catabolizante sobre as demais proteínas.

As secreções tiroideias também têm influência tanto nos processos de biossíntese como nos de modificação e degradação de triglicéridos. Um aumento nas hormonas tiroideias aumenta a degradação lipídica, diminuindo os depósitos de ácidos gordos e os níveis plasmáticos de triglicéridos, fosfolípidos e colesterol. Ocorre um aumento na secreção e perda de colesterol pelas fezes, assim como uma maior concentração de ácidos gordos livre na circulação sanguínea.

As hormonas tiroideias, juntamente com a somatotropina e a insulina, são essenciais para o crescimento e desenvolvimento. Atuam também em sinergia com a hormona de crescimento. A barreira placentária permite a passagem destas hormonas, não precisando o feto de as produzir, e sendo dependente da fonte materna. Nos recém-nascidos a concentração de T4 é maior que nos adultos, o que sugere uma hiperatividade funcional.

Nos vertebrados de sangue quente, as hormonas tiroideias são consideradas pré-requisitos para o crescimento normal. Embora o papel principal para esta função seja atribuído à somatotropina, as hormonas tiroideias têm efeito sobre o crescimento.

As iodotironinas estimulam específica e irreversivelmente a maturação esquelética. A sensibilidade entre os diferentes ossos às hormonas da tiróide é muito variável, ao ponto de que um excesso destas hormonas pode causar uma desmineralização óssea considerável.

Os glucocorticoides inibem a atividade tiroideia. Porém, o stress modifica os diferentes graus de resposta tiroideia. Assim, se a resposta adrenocortical ao stress falhar ou for insuficiente, pode ocorrer ativação do eixo hipotálamo-hipófise-tiróide.

As hormonas tiroideias provocam manifestações semelhantes à estimulação simpática com taquicardia, hipertensão arterial sistólica e menor tempo de circulação. Nos rins, as hormonas tiroideias aumentam a taxa de filtração glomerular e os tempos médios de filtração para as diferentes substâncias.

A T3 e T4 contribuem para o funcionamento normal do sistema nervoso central (SNC). Na deficiência de hormonas tiroideias, ocorre diminuição da mielina nas fibras nervosas e menor vascularização do SNC, provocando desordens mentais e letargia. Nos jovens, os neurónios podem sofrer danos irreversíveis se faltarem T3 e T4. Já o excesso de hormonas tiroideias causa efeitos estimulantes sobre o SNC, com hiperatividade e irritabilidade [4].

2.2.6 - Ações das hormonas da tiróide

As ações fisiológicas das hormonas tiroideias são classificadas em duas categorias: as que afetam o metabolismo e as que afetam o crescimento e desenvolvimento.

As hormonas tiroideias produzem um aumento geral do metabolismo de hidratos de carbono, gorduras e proteínas e regulam esses processos na maioria dos tecidos, sendo que a T3 é três a cinco vezes mais ativa que a T4 nesse aspeto.

Embora as hormonas tiroideias controlem diretamente a atividade de algumas das enzimas do metabolismo de hidratos de carbono, a maioria dos efeitos ocorre em conjunto com outras hormonas, tais como a insulina, glucagina, glucocorticoides e catecolaminas, verificando-se um aumento no consumo de oxigénio e na produção de calor, que se manifesta pelo aumento da taxa metabólica basal.

Isto reflete a ação dessas hormonas em tecidos como coração, rim, fígado e músculo, mas não em outros, como as gónadas, cérebro ou baço. A ação termogénica é importante como parte da resposta a ambientes frios.

As hormonas da tiróide têm efeito crítico no crescimento, em parte por ação direta nas células, e também indiretamente, por influenciar a produção de hormonas do crescimento e potencializar os seus efeitos nos tecidos alvos.

São importantes para a resposta normal às para-hormonas e à calcitonina e para o desenvolvimento do esqueleto; são também essenciais ao crescimento e maturação do sistema nervoso central.

Embora haja evidências de ações não genómicas, estas hormonas atuam principalmente através de um mecanismo dependente da ocupação de um membro da família TR (recetor da hormona tiroideia) de recetores nucleares. Dois genes distintos, TR α e TR β , codificam várias isoformas de recetores com funções diferentes. A T4 pode ser considerada uma pró-hormona, pois quando entra na célula, é logo convertida em T3, que, em seguida, liga-se a um membro da família TR com grande afinidade. É provável que essa interação ocorra no núcleo, onde as isoformas de TR atuam, geralmente, como repressores de genes-alvo. Quando a T3 se liga, os recetores alteram a sua conformação, o complexo coreceptor é libertado e um complexo coativador é recrutado, ativando a transcrição, o que resulta na geração de mRNA na síntese proteica [5].

2.2.7 – Distúrbios da Tiróide

As alterações da tiróide estão entre os distúrbios endócrinos mais comuns, sendo que esta doença é particularmente comum na meia-idade e na idade avançada. São acompanhadas de vários sintomas extra tiroidianos, particularmente no coração e na pele. Uma consequência de disfunção da tiróide é o cancro. Dependendo de onde ele esteja localizado, pode afetar todos os aspetos da função glandular, inclusive a captação de iodeto, expressão da TSH e síntese de tiroglobulina. Várias outras alterações da tiróide resultam de doenças auto-imunes, cuja origem ainda não está clara, mas pode estar relacionada com polimorfismos do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) ou de outros genes. Independentemente da causa, há duas formas principais de manifestação da doença.

No hipertiroidismo, há atividade excessiva das hormonas tiroideias, o que resulta numa taxa metabólica elevada, no aumento da temperatura da pele e da sudorese e conseqüentemente numa grande sensibilidade ao calor. Há vários tipos de hipertiroidismo, mas apenas dois são frequentes: bócio tóxico difuso (também chamado de doença de Graves ou bócio exoftálmico) e bócio tóxico nodular.

O bócio tóxico difuso é uma doença autoimune num órgão específico causada por imunoglobulinas estimulantes da tiróide direcionadas ao recetor de TSH. Também pode haver mutações ativas na constituição do recetor de TRH. Como indica o nome da doença, os pacientes com bócio exoftálmico apresentam protrusão do globo ocular. Esta patogénese ainda não está totalmente esclarecida, mas supõe-se que seja causada pela presença de proteínas semelhantes ao recetor de TSH nos tecidos da órbita ocular. Também se verifica sensibilidade aumentada às catecolaminas. O bócio tóxico nodular é causado por uma neoplasia benigna ou adenoma, e pode desenvolver-se em pacientes com bócio simples de longa duração. Essa condição, em geral, não apresenta exoftalmia concomitante.

A atividade reduzida da tiróide pode provocar hipotiroidismo e, nos casos graves, mixedema. Esta doença também tem origem imunológica, e as manifestações incluem taxa metabólica baixa, fala arrastada, voz rouca e profunda, letargia, bradicardia, sensibilidade ao frio e comprometimento mental.

A deficiência da função tiroideia durante o desenvolvimento, causada por ausência congénita ou desenvolvimento incompleto da tiróide, é o distúrbio endócrino mais prevalente no recém-nascido (1 em 3.000 - 4.000 nascimentos).

Esta doença causa o cretinismo, caracterizado por acentuado atraso do crescimento e deficiência mental [5].

2.3 - Bócio

O termo bócio, significa aumento da tiróide, podendo ser difuso ou nodular. A incidência de bócio aumenta com a idade. O tipo mais comum de bócio é o multinodular [6].

O bócio multinodular (BMN) manifesta-se através de um aumento da glândula da tiróide secundária à proliferação multifocal de tireócitos, resultando em estruturas foliculares heterogéneas. Os termos bócio adenomatoso, bócio nodular atóxico e bócio coloide nodular são usados indistintamente para descrever o BMN.

É uma patologia comum, clinicamente detetado em 2-6 % dos indivíduos em regiões com dieta suficiente de iodo, observando-se aumento da prevalência em áreas com deficiência de iodo.

A incidência do BMN, segundo a Organização Mundial de Saúde é dependente do sexo (relação mulher : homem é 5 : 1) e da ingestão de iodo da região, sendo que o bócio é considerado endémico quando a sua prevalência é maior do que 5 % na população. Quando ocorre numa percentagem menor de indivíduos, do que nas descritas em áreas endémicas, o bócio é denominado esporádico, embora as características morfológicas ou funcionais sejam indistintas daquelas do bócio endémico. Assim, o bócio esporádico e o bócio endémico correspondem fundamentalmente à mesma patologia da glândula da tiróide [7-9].

Do ponto de vista histológico, os nódulos benignos podem ser categorizados como lesões encapsuladas (adenomas) ou lesões sem cápsula (nódulos adenomatosos). Em termos funcionais, os nódulos são classificados como hipocaptantes (frios), normocaptantes ou hipercaptantes (quentes), dependendo da capacidade de captar iodo, detetada através da cintilografia da tiróide. Aproximadamente 85 % de todos os nódulos tiroideos são “frios” (hipocaptantes), sendo esses índices variáveis conforme o suplemento de iodo na região [7].

Os nódulos variam no tamanho, morfologia e função. Com o tempo, os nódulos do BMN, crescem e desenvolvem um hipertiroidismo subclínico, apresentando-se como Bócio Multinodular Tóxico (BMN).

A figura 2.6 representa a hipótese para a transformação nodular da tiróide. O ponto de partida é a hiperplasia induzida por um estímulo goitrogénico (exemplo: défice de iodo). O défice de iodo aumenta diretamente a mutagénese (havendo produção de H_2O_2 e radicais livres) ou indiretamente (através de mitoses). Por consequência, a hiperplasia forma clones. Alguns deles contêm mutações somáticas do recetor da hormona estimuladora da tiróide (TSHr) levando à formação de nódulos quentes (pontos vermelhos) ou se contêm mutações que conduzem a anaplasia e originam nódulos frios (pontos azuis) [10].

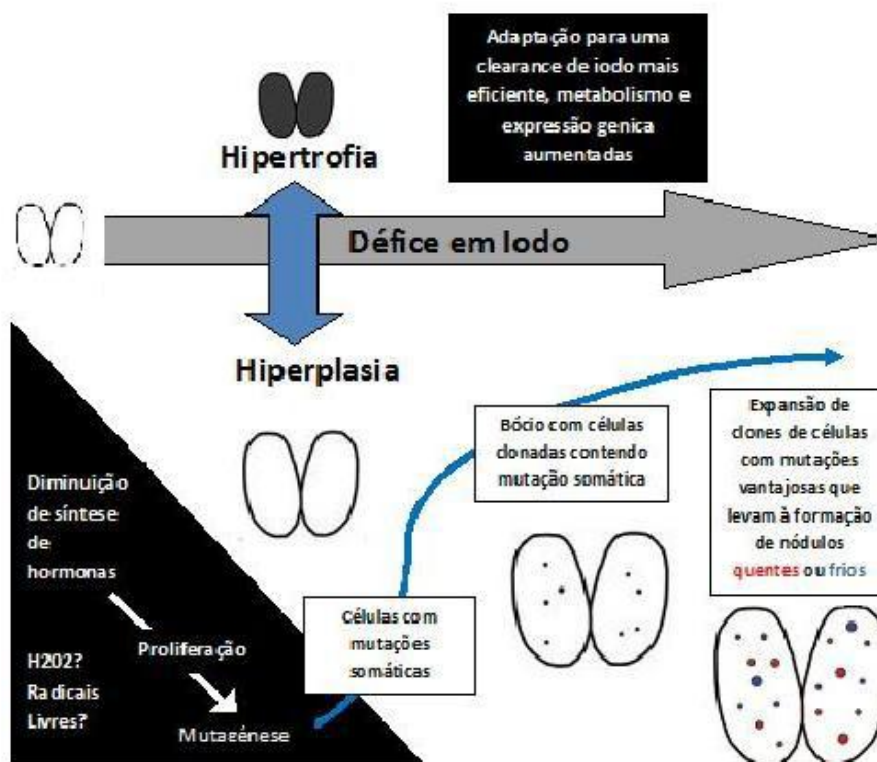


Figura 2.6 – Representação da hipótese para transformação nodular da tireóide [10].

É comumente aceite que a base para o desenvolvimento de estruturas nodulares é um estímulo precoce, que causa um aumento das estruturas da tireóide. Todavia, as manifestações clínicas de BMN podem apenas aparecer após um longo período.

O BMN é uma patologia frequente e geralmente benigna, estudos epidemiológicos sugerem uma prevalência, na América do Norte, de aproximadamente 3 a 7 % com base na palpação de nódulos. Com base na deteção ecográfica de nódulos, verifica-se uma prevalência entre 19-67 % na população geral. Em 20 a 48 % dos doentes com um único nódulo palpável, encontram-se ecograficamente nódulos adicionais [8, 11, 12].

Embora não sendo consensual, há fatores de risco para o desenvolvimento de BMN: o sexo feminino, o índice de Massa Corporal (IMC) $\geq 30 \text{ kg/m}^2$, o consumo tabágico, a história familiar de doença tiroideia, a idade, a exposição à radiação, a gravidez [8, 10, 13-15].

Existe também uma possível relação entre as patologias tiroideia e imunológica e as restantes endocrinopatias, destacando-se a Diabetes Mellitus 1 e 2; a artrite reumatoide, e ainda o síndrome de Down [16-19].

Existem estudos que revelam a importância de hábitos dietéticos, tais como; a não ingestão de sal iodado, o consumo de substâncias bociogénicas e o baixo teor de iodo na água, no desenvolvimento e/ou agravamento da patologia nos grupos de maior vulnerabilidade [13, 15, 20,21].

2.4 - Substâncias Bociogénicas

As substâncias naturais que podem interferir na função da glândula da tiróide são designadas bociogénicas. O termo deriva do nome "bócio", que significa um aumento da glândula da tiróide. Se a tiróide tem dificuldade em produzir hormonas, pode levar ao seu aumento como forma de tentar compensar essa produção hormonal inadequada.

Existem alimentos que contêm substâncias bociogénicas, onde se distinguem duas categorias gerais: os alimentos de soja, a isoflavona da soja que tem sido associada à diminuição da produção das hormonas da tiróide e os vegetais crucíferos. Além disso, existem outros alimentos não incluídos nestas categorias; tais como pêsegos, morangos e milho - que também contêm substâncias bociogénicas.

A ligação entre as Isoflavonas, que são responsáveis por uma grande variedade cromática nas plantas, e a diminuição da função da tiróide é, de facto, uma das poucas áreas em que a ingestão de flavonoides foi posta em causa. A genisteína, que é uma isoflavona, parece reduzir a produção de hormona da tiróide, bloqueando a atividade de uma enzima denominada peroxidase da tiróide, que é responsável pela adição de iodo nas hormonas tiroideias.

A segunda categoria de alimentos são os crucíferos que incluem vegetais tais como; nabo, brócolo, couve-flor, couve-de-bruxelas, couve e repolho. Nestes vegetais é a presença de isotiocianatos que tem sido associada à diminuição da função da tiróide. As isoflavonas e os isotiocianatos parecem reduzir a função da tiróide através do bloqueio da enzima peroxidase, e também por perturbarem as mensagens que são enviadas através das membranas das células da tiróide.

Na ausência de outras patologias da tiróide, não há evidências científicas que sugiram que os alimentos bociogénicos possam prejudicar negativamente o normal funcionamento desta glândula.

De facto, o oposto é verdadeiro: alimentos de soja e vegetais crucíferos têm um valor nutricional único, e a ingestão desses alimentos tem sido associado com a diminuição do risco da doença, em muitas pesquisas. Nesta altura, ainda não se dispõe de informação científica suficiente que permita relacionar o consumo de alimentos bociogénicos com a disfunção da tiróide. Os profissionais de saúde diferem muito nas suas perspetivas quanto ao facto de uma pessoa que tem problemas de tiróide, deve ou não limitar o seu consumo de alimentos bociogénicos. Contudo, o efeito de cozedura nos alimentos bociogénicos, apesar das pesquisas ainda serem limitadas neste domínio, parece provocar a inativação dos compostos bociogénicos. As Isoflavonas (encontradas em alimentos de soja) e os isotiocianatos (encontrados em vegetais crucíferos) parecem ser sensíveis ao calor, e cozinhar parece reduzir a sua atividade [22-28].

2.5 - Minerais

Os minerais são os compostos que permanecem como cinzas após a incineração de tecidos animais e vegetais. Podem ser divididos em duas categorias; elementos principais (Ca, P, K, Cl, Na, Mg) e elementos vestigiais (Fe, Zn, Cu, Mn, I, Mo). De acordo com as suas funções biológicas, podem ser divididos em elementos essenciais, para os quais as funções biológicas são conhecidas, elementos não essenciais, com funções desconhecidas, se as houver, e de elementos tóxicos, que podem ser ingeridos através de alimentos ou água ou absorvidos do ar.

Os elementos essenciais, incluindo os elementos principais e alguns elementos vestigiais, desempenham várias funções: como eletrólitos, como constituintes de enzimas e, como constituintes corporais, por exemplo, nos ossos e dentes. A tabela 2.1 sumariza os minerais essenciais ao organismo.

Tabela 2.1 - Minerais essenciais ao organismo [26].

Elemento	Constituinte (mg/Kg)	Elemento	Constituinte (mg/Kg)
Cálcio	10-20	Ferro	70-100
Fósforo	6-12	Zinco	20-30
Potássio	2-2,5	Cobre	1,5-2,5
Sódio	1-1,5	Manganês	0,15-0,3
Cloro	1-1,2	Iodo	0,1-0,2
Magnésio	0,4-0,5	Molibdénio	0,1

Determinação de Iodo e de Metais Pesados em Vegetais Bociogénicos

O fornecimento de minerais não depende apenas da ingestão de alimentos, mas principalmente da biodisponibilidade, que está relacionada com a composição dos alimentos. Assim, o potencial redox, o valor de pH determinam o estado de valência, solubilidade e, conseqüentemente, a reabsorção. Alguns constituintes dos alimentos, por exemplo, proteínas, péptidos, aminoácidos, polissacáridos, açúcares, e ácidos orgânicos, ligam-se a minerais podendo aumentar ou mesmo diminuir a sua reabsorção.

Existem cerca de 15 elementos vestigiais essenciais presentes nas hormonas, vitaminas, enzimas e outras proteínas que têm distintas funções biológicas. Além destes, existem outros elementos no corpo humano mas, as suas funções fisiológicas não foram ainda determinadas. Normalmente estão associadas com elementos relacionados, por exemplo, Li com o Na, ou Rb com o K. A tabela 2.2 sumariza os constituintes essenciais e não essenciais dos elementos vestigiais no organismo e a sua ingestão média diária de alimentos.

Tabela 2.2 – Constituintes essenciais e não essenciais e a sua ingestão média diária de alimentos [26].

Elemento	Conteúdo (mg/kg de peso molecular)	Dose (mg/dia)	Elemento	Conteúdo (mg/kg de peso molecular)	Dose (mg/dia)
Essencial			Não essenciais		
Fe	60	15	Rb	4,6	1-2
F	37	2,5	Br	2,9	7,5
Zn	33	6-22	Al	0,9	5-35
Si	14	33	Ba	0,3	1,3
Cu	1,5	3,2	Sn	0,2	4,0
As	0,3	0,02-0,03	Ti	0,1	0,9
Se	0,2	0,07			
Mn	0,2	2-48			
I	0,2	0,2			
Ni	0,1	0,4			
Mo	0,1	0,3			
Cr	0,1	0,005-0,2			
Co	0,02	0,002-0,1			

Elementos tóxicos (por exemplo, Sb, Cd, Hg, Ti e Pb) podem surgir em alimentos por várias vias.

Insuficiência nos elementos vestigiais essenciais resulta em alterações metabólicas que estão associadas principalmente com a ausência ou diminuição da atividade das enzimas metabólicas [26].

2.6 - Descrição dos minerais em estudo

2.6.1 - Iodo

O iodo, como componente estrutural, é o principal requisito para a síntese da hormona da tiróide e respetiva regulação. A carência em iodo é um problema mundial, sendo o bócio o principal a nível clínico. A deficiência em iodo leva à diminuição da produção hormonal da tiróide, resultando em proliferação celular, o bócio está relacionado com o aumento da secreção de TSH. Esta estimula o crescimento e atividade metabólica das células foliculares da tiróide, estimulando cada célula para o aumento da captação de iodo e síntese e secreção da hormona da tiróide. Este processo tende a conservar a quantidade de iodo e consequentemente manter o funcionamento normal da tiróide. Portanto, o aumento da glândula da tiróide começa como uma hiperplasia adaptativa à baixa ingestão de iodo. Quanto à sua absorção, nas zonas geográficas onde o fornecimento de iodo na dieta é adequado, o indivíduo adulto ingere cerca de 150 µg por dia [29].

Relativamente às suas fontes, o iodo é muito raro e encontra-se na natureza sob a forma de iodeto e iodato. O iodo é encontrado em quantidades extremamente variáveis nos alimentos e na água de beber. Os frutos do mar, tais como moluscos bivalves, lagostas, ostras, sardinhas e outros peixes de água salgada são ricos em iodo. O iodo elementar (I_2) é reduzido a ião iodeto (I^-) no lúmen gastrointestinal e a sua absorção, para a corrente sanguínea, ocorre ao longo de todo o trato gastrointestinal. Este é também absorvido a partir do trato entérico ligado a aminoácidos. Em casos de má absorção intestinal verifica-se uma diminuição da sua absorção. A distribuição celular do ião iodeto é similar à do ião cloreto, sendo largamente extracelular. No entanto, o seu volume de distribuição é superior ao volume extracelular, havendo várias razões que justifiquem esta grande distribuição. A primeira é pelo facto de o iodo estar numa concentração semelhante quer no interior dos glóbulos vermelhos quer no plasma.

A segunda é porque o iodo é marcadamente acumulado na glândula tiróide (corresponde a 80 % do iodo do organismo). Finalmente, pelas concentrações de iodo nas secreções gástricas e salivares excederem as suas concentrações nos fluidos extracelulares.

A concentração no plasma de iodo inorgânico é menos de 1 µg/100 mL e constitui apenas 10 a 20 % da concentração total. As hormonas da tiróide são as responsáveis pela maior parte do iodo presente no plasma.

No que diz respeito ao metabolismo do iodo, este ocorre sobretudo ao nível da glândula tiróide, processo do qual resulta a biossíntese das hormonas T3 e T4. A principal via do metabolismo do iodo que ocorre fora da glândula tiróide envolve o catabolismo das hormonas T4 e T3, resultante das reações de deiodinação, da quebra da ligação éter da tiroxina, da desaminação oxidativa e descarboxilação da cadeia lateral das iodotironinas, e ainda, da conjugação do grupo hidroxilo do anel aromático das iodotironinas com o ácido glucurónico e sulfato.

O processo de desaminação oxidativa e descarboxilação da alanina da cadeia lateral das iodotironinas representam cerca de 2 e 14 % do turnover da T4 e T3, respetivamente. As enzimas responsáveis por este mecanismo ainda não estão bem caracterizadas. Os produtos resultantes da desaminação oxidativa e descarboxilação da cadeia lateral das iodotironinas sofrem por sua vez deiodinação e conjugação com o ácido glucurónico e sulfatos [30-33].

De um modo geral, foi implementado a iodização do sal, sendo a principal estratégia utilizada para controlar a carência de iodo. Na maioria dos países onde a deficiência de iodo foi identificada como um problema de saúde pública, medidas de controlo foram implementadas. Globalmente, 66 % dos domicílios já têm acesso a sal iodado [34-36].

2.6.2 - Selénio

O selénio é um mineral bastante raro, não sendo encontrado muito facilmente e mesmo onde é encontrado, é escasso.

O selénio entra na cadeia alimentar através das plantas, as quais retiram o oligoelemento do solo. Devido a isso, a deficiência de selénio foi identificada em locais do mundo cujo solo seja pobre nele. Isto normalmente ocorre em regiões vulcânicas com solo ácido.

As plantas são as maiores fontes dietéticas de selénio. O conteúdo de selénio no alimento, depende da sua presença no solo aonde estas plantas se desenvolveram. Na Europa, o solo é relativamente pobre em selénio, com os menores níveis encontrados na Espanha, Grécia e na Europa de Leste. Os níveis mais elevados encontram-se nos Estados Unidos.

As principais fontes alimentares são: castanhas, semente de girassol, nozes, arroz, macarrão, ovos, carne de frango, atum, camarão, bacalhau, sendo que a fonte mais rica neste oligoelemento é a castanha de caju.

A importância do selénio no organismo dá-se por este, ser um componente das selénio-proteínas, as quais apresentam importantes funções enzimáticas. Desta forma, o selénio tem uma função importante como redutor, principalmente na neutralização dos radicais livres.

Quanto à biodisponibilidade, o selénio consumido em alimentos e em suplementos apresenta-se num número variado de formas orgânicas e inorgânicas, incluindo a selénio-metionina (presente em fontes animais, vegetais e suplementos), a selénio-cisteína (presente em fontes animais), o selenato e o selenito (presentes em suplementos).

A biodisponibilidade e a distribuição tecidual dependem da forma ingerida. Por exemplo, a selénio-metionina é mais eficiente em aumentar as reservas orgânicas de selénio porque liga-se de uma forma não seletiva a outras proteínas (hemoglobina e albumina), além da metionina. Porém, a selénio-metionina não apresenta uma atividade catalisadora, precisando transformar-se num precursor inorgânico para desempenhar esta função. Desta forma, o selenito e o selenato apresentam-se como formas mais eficientes, pois precisam apenas de sofrer uma redução para fornecerem ao selénio fosfato, o precursor da selénio-cisteína, a forma ativa do selénio nas selénio-proteínas [37].

A função mais conhecida do selénio é a de antioxidante, devido à associação desse elemento com a enzima glutathione peroxidase.

Além de atuar na destoxificação do peróxido de hidrogénio e de outros peróxidos orgânicos, a glutathione peroxidase atua também na manutenção de grupos sulfidrilas vitais na forma reduzida, na síntese de hormonas derivadas do ácido araquidónico e no metabolismo de compostos estranhos ao organismo, por exemplo, compostos aromáticos derivados de plantas e pesticidas; atua, ainda, como co-factor no metabolismo de certos aldeídos, por exemplo, o formaldeído e o metilglicoxal e, supostamente, no transporte de alguns aminoácidos nos rins.

Recentemente, constatou-se que o selénio é um constituinte da 5' - iodinase, enzima atuante no metabolismo das hormonas da tiróide, e que as síndromes de deficiência de iodo são mais graves quando há deficiência simultânea de selénio.

Algumas pesquisas [37-38] mostram que a concentração de selénio nos alimentos pode apresentar grande variação dependendo dos teores presentes no solo.

Em função da importância do selénio, é necessário conhecer a composição nutritiva dos alimentos, de forma a garantir um consumo adequado deste elemento por parte da população [38].

O selénio é ingerido e absorvido como selenite, selenato e selenometionina. A tiróide humana contém a maior concentração de Se por unidade de peso entre todos os tecidos e a maioria do selénio é incorporado nos tirócitos.

O selénio participa como antioxidante. A enzima seleno-fosfato sintetase catalisa a síntese de mono-selénio fosfato, um precursor da seleno-cisteína, um aminoácido encontrado no centro catalítico de muitas enzimas envolvidas na defesa celular contra radicais livres e em metabolismo e funções das hormonas da tiróide.

Três tipos de selénio contendo glutathione peroxidase (GPx) foram encontrados em tecidos da tiróide: GPx celular, GPx plasma e GPx fosfolípido hidroperóxido.

GPx tem sido encontrada em muitos tecidos e atua como enzima antioxidante que reduz potencialmente dano das espécies reativas de oxigénio, como o peróxido de hidrogénio e hidroperóxido lipídico pelo acoplamento da redução com a oxidação da glutathione.

Neste sentido, Se suporta a atividade da vitamina E no limite da oxidação dos lípidos e previne alguns dos danos resultantes da deficiência de vitamina E, no tecido da tiróide, GPx coopera com peroxisomal catalase em proteger as células da degradação de H_2O_2 , do ataque de radicais livres.

Outra enzima contendo selénio é a tioredoxina redutase que mantém tioredoxina na forma reduzida, participando na regeneração de vários sistemas antioxidantes, como a vitamina C.

As 3 iodotironinas deiodinases são seleno-enzimas. Os três tipos diferem nos substratos de afinidade, mecanismos de reação, especificidade tecidual, regulação pelo substrato, produtos ou outros fatores e resposta a agentes farmacológicos.

O Tipo I, iodotironina deiodinase (D1), é a mais abundante e melhor caracterizada das 3 deiodinases, catalisa a 5' - deiodinação de T₄, rT₃ e outras iodotironinas ou seus sulfoconjugados. É maioritariamente expressa no fígado, rim, tiróide e pituitária. O fígado e a D1 produzem a maior parte da T₃ circulante em condições normais. D1 também participa no local de produção de T₃ a partir de T₄ em alguns órgãos. É uma enzima de membrana localizada no retículo endoplasmático dos hepatócitos, enquanto no rim e tiróide é encontrada na membrana do plasma basolateral, sendo o seu local de ativação direcionado para o citosol. O substrato e/ou produtos das enzimas (T₄ e T₃) induzem a sua expressão. A atividade D1, é estimulada em hipertiroidismo e diminuída em hipotiroidismo, a severa deficiência de Se reduz atividade de D1.

O Tipo II, iodotironina deiodinase (D2) gera T₃ a partir de T₄, com elevada especificidade para T₄ e uma maior afinidade para T₄ do que D1, além disso, a D2 é rapidamente inativada pela T₄ e rT₃. A sua transcrição é inibida pela T₃, assim a sua regulação é inversa à da D1 e D3. É altamente expressa no sistema nervoso central, com grandes níveis de células gliais e neurónios, onde a maioria dos recetores T₃ são expressos. Assim, T₃ é produzida pela ação de D2 em células gliais e depois é transportada aos neurónios adjacentes que contém recetores T₃. O maior regulador da expressão de D2 no cérebro, são as hormonas da tiróide. Porque o cérebro depende fortemente da oferta de T₄ proveniente da tiróide e a T₃ circulante provavelmente chega ao cérebro em quantidades limitadas ou em condições patológicas. Uma tiróide funcional e quantidades de Se adequadas são cruciais tanto para o desenvolvimento como em organismos adultos. O stress, o ritmo cardíaco elevado e drogas severas neurodegenerativas afetam as enzimas deiodinases no cérebro e os níveis de hormonas da tiróide.

Deficiência em selénio compromete a tolerância em animais, o que implica uma baixa expressão de D2 no tecido adiposo, associado ao decréscimo da produção de T₃. D2 serve para manter os níveis de T₃ nos tecidos, face à variação de concentrações de T₄ e T₃ no plasma, embora, a identificação da expressão de D2 no músculo-esquelético possa levar à hipótese que parte do T₃ no plasma pode ser gerada pela atividade da D2.

O Tipo III, iodotironina deiodinase (D3) medeia a inativação de hormonas da tiróide. O principal metabolito da D3, rT₃ compete pela deiodinação no metabolismo das hormonas da tiróide, uma vez que, os níveis de rT₃ circulante estão na gama de formação de T₃ e rT₃ elevados e são encontrados no sistema nervoso central.

Um papel biológico para este metabolito é durante o desenvolvimento do cérebro, bem como, modulador do estado de polimerização da actina no citoesqueleto e migração neuronal.

Na idade adulta, elevados níveis de D3 são mantidos no cérebro e pele, em vários outros tecidos e na placenta. Mas nenhuma expressão de D3 é encontrada no fígado ou rim de um adulto normal. Sendo assim, o cérebro é preponderante em expressar D3 em tecidos de animais adultos, podendo assim ser o principal local de clearance plasmática de T3 e produção plasmática de rT3. D3 é considerado para evitar uma exposição inapropriada de células ou tecidos que ativam a hormona T3 e expressão ao nível da placenta e útero. A D3 pode desempenhar um papel importante na proteção contra o feto, da exposição excessiva da hormona da tiróide. Atividade da D3 é aumentada em hipertiroidismo e diminui em hipotiroidismo, no cérebro e pele, mas não na placenta. Não existem certezas para a regulação da expressão de D3 no cérebro pelo selénio e uma menor evidência foi apresentada na placenta [31].

O papel do Se como parte integrante de enzimas iodotironinas deiodinases, conjuga o selénio e o iodo numa inter-relação potencialmente importante, em que o grau de adequação de um elemento pode influenciar o metabolismo de outro.

As enzimas iodotironinas deiodinases convertem a pro-hormona tiroxina (T4) na forma ativa triiodotironina (T3), necessárias ao normal crescimento e desenvolvimento, e para a produção de energia e consumo de O₂ nas células. O Tipo I deiodinase, abundantes no fígado e rim, são sensíveis à carência de Se, o que diminui a atividade e posterior conversão de T4 a T3, resultando num decréscimo da razão T3:T4. Por outro lado, Tipo II e Tipo III deiodinases, são menos sensíveis à carência de selénio, indicando a sua importância para a manutenção dos níveis normais das hormonas da tiróide.

O Se como enzima antioxidante glutaciona peroxidase (GPx) pode proteger a glândula da tiróide do dano oxidativo, causado por excesso de produção de H₂O₂, durante a síntese de hormonas da tiróide [29,39,40].

2.6.3 - Manganês

O manganês é um dos elementos mais abundantes na crosta terrestre e encontra-se largamente distribuído em solos, sedimentos, rochas, água e materiais biológicos. É importante para o crescimento das plantas e em funções vitais dos animais superiores.

As exposições ocupacionais mais significativas ocorrem pelos fumos e poeiras do manganês, sendo o trato respiratório a principal via de introdução e absorção. À parte desta via, o manganês também pode ser absorvido ao longo de todo o intestino delgado quando difundido na alimentação.

O manganês é um elemento que surge naturalmente e em pequenas quantidades é essencial para o ser humano. No entanto, quando presente no organismo em elevadas quantidades pode causar efeitos tóxicos a diferentes níveis, sendo os mais preocupantes a nível do sistema nervoso central. No sangue, o manganês encontra-se principalmente nos eritrócitos. Em níveis mais elevados é possível encontrá-lo no fígado, conjugado aos sais biliares. A distribuição do manganês é grande nos tecidos e líquidos do organismo, principalmente onde a atividade das mitocôndrias é maior. O papel do manganês é considerável na medida em que ele ativa numerosas enzimas implicadas em variados processos fisiológicos. As fontes mais ricas de manganês são os grãos integrais, leguminosas, nozes e chás, as frutas e vegetais são fontes moderadas [41].

Como cofator enzimático, o manganês desempenha um papel importante em vários processos fisiológicos, por exemplo, é o principal desintoxicante de espécies reativas de oxigénio na mitocôndria, a superóxido dismutase – Mn (MnSOD), requer manganês para a atividade. No entanto, quando presente em elevadas concentrações, pode apresentar toxicidade celular, principalmente no cérebro.

A exposição a níveis elevados de manganês durante o desenvolvimento do feto, pode provocar deficiências neurocognitivas, enquanto em adultos, a acumulação de manganês nos gânglios basais, pode levar a um decréscimo de dopamina e morte celular, e resulta num síndrome denominado manganismo, que tem vários precursores com a doença de Parkinson. A dopamina, é o neurotransmissor mais importante, também é um regulador da atividade de secreção de TSH e TSH subunidades. Além disso, dopamina e recetores dopaminérgicos, estão envolvidos no neurodesenvolvimento. Assim sendo, a hipótese de um controlo anormal na síntese e função das hormonas da tiróide, pode estar associado a uma exposição de manganês durante o neurodesenvolvimento fetal.

O manganês pode afetar a homeostase das hormonas da tiróide e processos de desenvolvimento neurológico, como resultado tanto direto da desregulação a nível da glândula da tiróide e hormonas da tiróide, ou indiretamente, através de alterações dopaminérgicas no controlo da glândula da tiróide e suas hormonas.

A dopamina é conhecida como um modulador de secreção de ambas, TSH e subunidades TSH. Os efeitos dos danos do manganês nos neurónios dopaminérgicos (devem ser inerentes à exposição pré-natal ou pós-natal precoce), podem resultar em efeitos intensos na síntese de hormonas da tiróide, devido a alterações na TSH. As hormonas da tiróide, por sua vez, desempenham um papel importante na promoção de processos de desenvolvimento neurológico, tais como, sinaptogénese, vesículas sinápticas, recaptação de neurotransmissores e sinalização de recetores de fatores de crescimento.

O manganês pode afetar as hormonas da tiróide diretamente pela regulação de enzimas deiodinases [42]. O manganês é um componente integral de numerosas enzimas, como a arginase, colinesterase, fosfoglucomutase, piruvato carboxilase e enzimas antioxidantes intracelulares, como a superóxido dismutase (MnSOD).

Desempenha um papel importante em vários processos fisiológicos, incluindo mineralização óssea, metabolismo proteico e energético, regulação metabólica e proteção celular de danos provocados pelas espécies de radicais livres.

No entanto, manganês é potencialmente tóxico a níveis elevados, e pode causar efeitos adversos na saúde, incluindo défices neurocognitivos e decréscimo dos níveis de dopamina. Sendo a dopamina, o maior neurotransmissor, e também é conhecido como um modulador inibitório da secreção de TSH.

Considerando estes factos, foi proposto recentemente que o manganês, pode afetar a homeostase das hormonas da tiróide e os processos de neuro-desenvolvimento, devido à desregulação direta da glândula da tiróide ou hormonas da tiróide, ou indiretamente através de alterações no controlo dopaminérgico da glândula da tiróide e das suas hormonas. Pode interferir também com a atividade deiodinase e portanto, afetar as concentrações circulantes de hormonas na tiróide [29,40].

2.6.4 - Zinco

O zinco possibilita várias funções bioquímicas, pois é componente de inúmeras enzimas, dentre estas, álcool desidrogenase, superóxido dismutase, anidrase carbónica, fosfatase alcalina e enzimas do sistema nervoso central. Participa na divisão celular, expressão génica, processos fisiológicos como crescimento e desenvolvimento, na transcrição genética, na morte celular, age como estabilizador de estruturas de membranas e componentes celulares, além de participar na função imune e desenvolvimento cognitivo [43].

O zinco é conhecido há muito tempo como essencial para os microrganismos, sendo distribuído por todo o reino vegetal e animal em abundância em segundo lugar em relação ao ferro. Algumas das principais fontes desse mineral são: carnes bovinas, peixes, aves, leite e derivados, ostras, mariscos, cereais, nozes e feijão [44].

Diversas enzimas e proteínas contendo zinco participam no metabolismo de proteínas, hidratos de carbono, lípidos e ácidos nucleicos. Nas enzimas, o zinco pode ter função catalítica ou estrutural. Dentre as aproximadamente 300 enzimas das quais o zinco faz parte estão, a anidrase carbónica, fosfatase alcalina, carboxipeptidases, álcool desidrogenase, superóxido dismutase, proteína C quinase, ácido ribonucleico polimerase e transcritase reversa. O zinco está ainda envolvido na estabilização de membranas estruturais e na proteção celular, prevenindo a peroxidação lipídica.

O papel fisiológico do zinco como antioxidante é evidenciado por 2 mecanismos: proteção de grupos sulfidrílo contra oxidação, e na inibição da produção de espécies reativas de oxigénio por metais de transição como ferro e cobre. O zinco participa da estrutura da superóxido dismutase (SOD), sendo a atividade desta enzima reduzida pela deficiência deste mineral.

O zinco é um mineral que desempenha papel na organização polimérica de macromoléculas como DNA e RNA, e é indispensável para a atividade de enzimas envolvidas diretamente com a síntese de DNA e RNA, como por exemplo a RNA polimerase. Além disso, influencia a divisão celular, por meio da atividade da dioxitimidina quinase e adenosina (5') tetrafosfato (5') - adenosina.

Defeitos na síntese ou prejuízo da função do RNA mensageiro parecem ser induzidos pela deficiência de zinco [43].

Estudos *in vitro* apontam que o zinco participa como cofator da enzima deiodinase Tipo II na conversão periférica de tiroxina (T4) em triiodotironina (T3). Nesse sentido, têm sido demonstradas alterações na função e metabolismo das hormonas da tiróide, caracterizando o hipotiroidismo subclínico. A carência de zinco está associada a algumas patologias, tais como, na anemia falciforme, diabetes mellitus, cirrose, e síndrome de Down [45].

2.6.5 - Cobre

O cobre é um nutriente essencial ao Homem. É necessário para o funcionamento das cuproenzimas que estão envolvidas em vários processos bioquímicos como a síntese proteica, síntese de neurotransmissores, produção de energia, metabolismo celular do ferro e o sistema de defesa contra radicais livres. O cobre é necessário para assegurar as propriedades estruturais e catalíticas das cuproenzimas, atuando como cofator ou como componente alostérico. É essencial para o bom funcionamento de proteínas específicas, como: tirosinase (produção melanina - pigmentação), monoamina oxidase (síntese de colagénio), diamina oxidase, dopamina β -hidroxilase (produção de catecolaminas), *p*-hidroxifenil piruvato, superóxido dismutase (proteção antioxidante). Em síntese, os processos bioquímicos dependentes de cobre incluem: produção de energia durante a respiração, síntese de proteínas estruturais, como colagénio e elastina, síntese do neurotransmissor noradrenalina, síntese do pigmento melanina, sistema de defesa contra radicais livres e metabolismo celular do ferro [46].

O metabolismo do cobre está relacionado com o do ferro, através da atividade ferroxidase da proteína ceruloplasmina. O cobre está envolvido na oxidação de Fe^{2+} em Fe^{3+} , tornando possível a transferência deste último para a proteína transferrina sérica. Mais de 65 % do cobre sérico presente em vertebrados encontra-se associado ao complexo proteico da ceruloplasmina. Este complexo também tem um papel importante na defesa antioxidante, já que diminui o stress oxidativo induzido pelo Fe^{2+} [47].

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a toxicidade celular induzida por cobre. Frequentemente, a base das teorias é a disponibilidade dos iões cobre para participar na formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) [46,47].

O cobre atua tanto como um antioxidante e pro-oxidante no organismo, a deficiência de cobre tem sido associada à diminuição de níveis plasmáticos de T3 em animais e no Homem.

Estudos demonstram que níveis elevados de cobre, em doentes com bócio multinodular, indicam uma ligação entre o cobre e a função da tiróide e um possível subsequente desenvolvimento de bócio [29].

Capítulo 3 – Fundamentos Práticos

Capítulo 3 – Fundamentos Práticos

3.1 - Amostras

As amostras analisadas foram da espécie *Brassicaceae Napus* (nabo), provenientes da zona interior (Covilhã) e da zona litoral (Leiria). Utilizou-se a raiz, e estas foram colhidas e analisadas no decorrer do trabalho experimental.

As amostras foram fracionadas e parte retirada para determinação da % de humidade, através do processo de perda de substâncias voláteis numa estufa (Memmert) a 100 ± 5 °C, sendo o restante colocado à mesma temperatura até total secagem, para posterior determinação de iodo e extração sequencial.

As amostras secas foram calcinadas a 600 ± 10 °C, por um período mínimo de 2 horas, numa mufala (Vulcan 3-550 Ney). As cinzas resultantes foram utilizadas na determinação de iodo, pela reação de Sandell-Kolthoff diretamente, e pelo método de espectrometria de absorção atómica em chama, foram dissolvidas em HCl 2,0 M e transferidas quantitativamente para um balão volumétrico de 25 mL, para determinar o teor total dos metais em estudo; Cobre, Manganês, Selénio e Zinco [48-50].

3.2 - Método da Determinação do Iodo

A principal dificuldade é a volatilidade do iodo, quando presente na forma elementar ou na forma dos seus compostos voláteis.

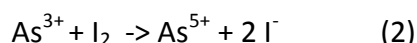
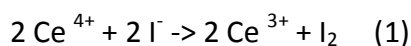
Os procedimentos para a determinação de iodo diferem nos métodos de decomposição, da amostra, princípios analíticos, limites de deteção, precisão, especificidade e seletividade, robustez e sensibilidade aos interferentes. A partir do ponto de vista prático, eles também diferem na facilidade de execução, equipamentos necessários, tempo e custos envolvidos.

Em geral, o teor de iodo nos alimentos é baixo, normalmente na gama de 10-200 µg/kg, portanto, são necessários métodos analíticos, com limite de deteção suficientemente baixos.

Um dos principais objetivos deste trabalho foi dosear o iodo, que se supõe existir em quantidades muito baixas, através de um método adequado. Com base na literatura já disponível, utilizou-se o método de Sandell-Kolthoff, com pequenas alterações [51-56].

A principal modificação foi na preparação da solução de arsénio, que segundo o método da reação de Sandell-Kolthoff, seria preparada através de uma mistura ácida, com H_2SO_4 , NaCl , As_2O_3 e KOH , com uma concentração final de 2,25 M. No entanto, verificou-se que não permitia obter valores de resultados aceitáveis, pelo que a solução foi preparada somente com As_2O_3 e KOH , com uma concentração final correspondente a 0,25 M.

A reação de Sandell-Kolthoff, denominada por reação de catalisação do iodo, entre o arsénio III e cério IV é amplamente utilizada para a determinação de pequenas quantidades de iodo. Considerado um método cinético e espectrofotométrico, onde a redução do amarelo de Ce (IV) por As (III) para incolor Ce (III) é normalmente muito lenta. Esta reação é catalisada por pequenas quantidades de iodeto. A reação traduz-se pelas equações químicas (1) e (2).



O iodeto catalisado pela reação entre o ião cério IV e o arsénio III tem sido utilizado numa variedade de análises. O iodeto é determinado na presença de iodato, aproveitando o facto de que o iodato está inativo, como um catalisador. Ambos, iodeto e iodato são determinados através da redução do iodato para uma forma cataliticamente ativa usando arsénio III. O arsénio III reduz lentamente o iodato a um estado que tem atividade catalítica igual a uma quantidade equivalente de iodo. Iodo total (iodeto e iodato) de uma amostra é determinado pela redução do iodato com arsénio III e em seguida, é possível determinar o iodo total por um processo catalítico.

Para concentrações elevadas de arsénio III e temperatura elevada, o tempo de conversão quantitativa de iodeto a iodato é reduzido significativamente, sendo assim, no procedimento para determinar iodeto, na reação com arsénio III é necessário ter em conta a temperatura, para que ocorra a completa conversão do iodato para a forma cataliticamente ativa.

Na presença de baixas concentrações de arsénio III, cério IV pode oxidar o iodeto a uma forma cataliticamente inativa. Cério IV é utilizado para oxidar iodeto a iodato cataliticamente inativo.

No método pela reação de Sandell-Kolthoff, é utilizado um reagente denominado brucina, este como é altamente tóxico a sua utilização passou a ser limitada. Sendo assim, outra alteração ao método pela reação de Sandell-Kolthoff, implicou a substituição da brucina por ácido difenilamina-4-sulfónico, sendo utilizado para parar a reação entre arsénio, cério e iodeto após um certo tempo [51-56].

3.3 - Validação do Método da Determinação do Iodo

A validação de um método analítico permite demonstrar que o método é “adequado ao uso” pretendido.

Sendo assim, comprova-se através de evidências objetivas, que requisitos para uma determinada aplicação ou uso específico são atendidos. Pode ser definida como o processo que confere validade a um método analítico, instrumento ou equipamento, cujas especificações são aceites como corretas, conferindo confiabilidade aos resultados obtidos. Validar um resultado significa que o procedimento, que inclui desde as condições de operação do equipamento até toda a sequência analítica, seja aceite como correto. Para isso, estabelecem-se níveis de exigência que podem definir a aprovação do produto ou espécies em estudo.

A validação inclui, especificação de requisitos, determinação de características do método, uma verificação de que os requisitos podem ser satisfeitos utilizando o método em causa e uma declaração de validade. Os parâmetros de validação de um método analítico incluem, Especificidade / Seletividade, Gama de trabalho, Linearidade, Sensibilidade, Limiares Analíticos do método de ensaio (limite de deteção e limite de quantificação), Precisão (repetibilidade, reprodutibilidade e precisão intermédia), Exatidão, e Robustez [57-62].

A validação pode ser feita de duas formas uma direta e outra indireta. A validação direta inclui todos os parâmetros atrás referidos exceto a exatidão que corresponde à indireta, onde são feitos estudos comparativos com materiais de referência, ensaios interlaboratoriais e testes comparativos.

3.3.1 – Especificidade / Seletividade

O termo especificidade, muitas vezes utilizado como sinónimo de seletividade, define a capacidade do método em detetar o analito de interesse na presença de outros componentes da matriz. Já a seletividade refere-se à capacidade de deteção de substâncias. O processo para demonstrar a especificidade do método depende do seu objetivo.

Em diversas técnicas analíticas esse parâmetro pode ser estabelecido pela comparação do resultado obtido com a combinação de vários fatores. Outra maneira de avaliar envolve a adição de padrão analítico ou a comparação com o padrão externo.

A seletividade do método deve ser estudada usando várias amostras, desde soluções padrão a misturas de matrizes complexas ou elementos considerados potenciais interferentes.

A seletividade do método é demonstrada pelo desvio dos resultados obtidos pela análise do analito em causa em amostras fortificadas com todos os potenciais interferentes e os resultados obtidos com amostras não fortificadas, isto é, contendo somente o analito. Quando se desconhecem os interferentes, a seletividade do método pode ser investigada por comparação dos resultados obtidos com outros métodos.

Diz-se que um método é específico quando permite discriminar o analito relativamente a outras substâncias, eventualmente presentes na amostra, ou seja, quando oferece garantias que a grandeza medida provém apenas do analito.

Para avaliar as interferências realiza-se um teste de recuperação utilizando como base a mesma matriz, em que apenas se varia a concentração de analito (em proporções conhecidas e abrangendo a gama de trabalho).

Um método analítico pode ser considerado aplicável (específico e seletivo) quando na prática, e após a realização de testes de recuperação, se verifica que a taxa de recuperação é próxima de 100 %.

O cálculo da taxa de recuperação é feito através da equação (3).

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{(C_{\text{amostra+padrão}}) - (C_{\text{amostra}})}{C_{\text{padrão}}} \times 100 \quad (3)$$

3.3.2 – Gama de Trabalho

Em qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentrações do analito na qual o método pode ser aplicado. Os primeiros valores da gama podem ser dos valores dos limites de deteção e de quantificação e os últimos dependem do sistema de resposta do equipamento de medição.

A faixa linear de trabalho de um método de ensaio é o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito no qual foi demonstrado ser possível a determinação com a precisão, exatidão e linearidade exigidas, sob condições especificadas para o ensaio.

A faixa linear é definida como a faixa de concentrações na qual a sensibilidade pode ser considerada constante e é normalmente expressa nas mesmas unidades do resultado obtido pelo método analítico.

Numa metodologia que envolve o traçado de uma reta de calibração, a gama de trabalho pode ser avaliada pelo teste de homogeneidade das variâncias.

As variâncias associadas ao primeiro e último padrão (S_1^2 e S_{10}^2 quando utilizadas 10 réplicas) são calculadas para avaliar se existem diferenças significativas entre elas, nos limites da gama de trabalho. Para tal, quando $S_1^2 > S_{10}^2$ efetua-se o cálculo do valor teste PG, através da equação (4).

$$PG = \frac{S_1^2}{S_{10}^2} \quad (4)$$

Comparando-se este valor de PG com o valor tabelado da distribuição F de Snedecor/Fisher, para n-1 graus de liberdade.

Se $PG \leq F$: as diferenças de variância não são significativas e a gama de trabalho está bem ajustada.

Se $PG \geq F$: as diferenças de variância são significativas e a gama de trabalho deve ser reavaliada até que a diferença entre as variâncias relativas ao primeiro e último padrão permitam obter $PG \leq F$.

3.3.3 – Linearidade

Linearidade é a habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, numa dada gama de concentração. A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito.

A linearidade é obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real.

A forma algébrica da equação de uma reta é dada pela expressão (5).

$$Y = a + b x \quad (5)$$

Em que **a** representa a ordenada na origem e **b** o declive.

Os coeficientes **a** e **b** dão uma estimativa da verdadeira função que é limitada pela dispersão inevitável do método.

A precisão da estimativa é quantificada pelo desvio padrão residual ($S_{Y/x}$) e (S_Y) das funções de calibração linear e não linear, correspondentes às equações (6) e (7) respetivamente.

$$S_{Y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [Y_i - (a + b \cdot x_i)]^2}{N - 2}} \quad (6)$$

$$S_Y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (Y_i - \hat{Y}_i)^2}{N - 3}} \quad (7)$$

onde

$$\hat{Y}_i = a + b \cdot X_i + c \cdot X_i^2 \quad (8)$$

em que,

X_i = concentração da amostra padrão;

Y_i = variável de resposta para uma concentração X_i ;

\hat{Y}_i = variável de resposta para o padrão de concentração X_i calculado a partir da função de calibração;

N = número de padrões de calibração.

Este desvio padrão exprime a dispersão dos valores do sinal instrumental em torno da curva de calibração.

Os desvios padrão da ordenada na origem **a** e do declive **b**, são dados pelas equações (9) e (10), respetivamente.

$$S_a = s_{Y/X} \times \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N x_i^2}{N \times \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} \quad (9)$$

$$S_b = \frac{s_{Y/X}}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} \quad (10)$$

Podendo ser usados para calcular os limites de confiança de **a** e **b**, de acordo com as equações (11) e (12).

$$\mathbf{a} \pm t \cdot S_a \quad (11) \qquad \mathbf{b} \pm t \cdot S_b \quad (12)$$

Sendo **t** o valor da variável de Student para o nível de confiança desejado e (N-2) graus de liberdade.

A linearidade pode ser avaliada através de um modelo estatístico. A forma mais expedita de verificar a linearidade de uma calibração é através da observação da representação gráfica do conjunto de pares ordenados (concentração; absorvência) utilizado na calibração. A partir destes conjuntos de pares ordenados calcula-se a função de calibração linear e a função de calibração não linear, bem como os respetivos desvios padrão residuais $S_{Y/X}$ e S_y .

A diferença das variâncias (DS^2) é calculada pela equação (13).

$$DS^2 = (N - 2) \cdot S_{Y/X}^2 - (N - 3) \cdot S_y^2 \quad (13)$$

Em que N é o número de padrões de calibração.

Calcula-se o valor teste, PG de acordo com a equação (14).

$$PG = \frac{DS^2}{S_{Y/X}^2} \quad (14)$$

Compara-se este valor de PG com o valor tabelado da distribuição F de Snedecor/Fisher:

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

Se $PG \geq F$: a função de calibração não é linear. Neste caso deve-se avaliar a possibilidade de reduzir a gama de trabalho.

3.3.4 – Sensibilidade

Sensibilidade é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração de analito.

Pode ser expressa pela inclinação da reta de regressão linear de calibração, e é determinada simultaneamente com os testes de linearidade. A sensibilidade depende da natureza do analito e da técnica de deteção utilizada.

3.3.5 - Limiares Analíticos do método de ensaio

Os conceitos de limite de deteção (LD) e de limite de quantificação (LQ) devem ser entendidos conforme recomendado pela IUPAC.

Limite de deteção é a menor quantidade do analito presente numa amostra que pode ser detetado, porém não necessariamente quantificada, sob condições experimentais estabelecidas.

Corresponde ao início da gama em que é possível distinguir com uma dada confiança estatística (normalmente 95 %), o sinal do branco do sinal da amostra, e como tal indicar se o analito em questão está ausente ou presente; a gama entre LD e o LQ deve ser entendida como uma zona de deteção qualitativa, e não quantitativa, pelo que não se devem reportar valores numéricos nesta gama.

Limite de quantificação é a menor quantidade do analito numa amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas.

Onde o limite de quantificação é estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do analito até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis.

Corresponde ao início da gama em que o coeficiente de variação (incerteza relativa) do sinal se reduziu a valores razoáveis (normalmente 10 %) para se poder efetuar uma deteção quantitativa; deste modo, na prática deve usar-se o LQ como início da zona em que se reportam valores numéricos.

Assim, na gama baixa, o 1º padrão de calibração deve ser igual ou ligeiramente superior ao limite de quantificação.

Podem ser usados dois métodos para o cálculo dos referidos limites:

- A partir de uma série de ensaios com um branco representativo (ou um padrão de baixa concentração, caso o branco não tenha valor significativo), e calculando a respetiva média e desvio padrão; é favorável a utilização de brancos independentes para obter esta estimativa (dias diferentes, condições de rotina), pelas equações (15) e (16).

$$LD = x_0 + 3 S_0 \quad (15)$$

$$LQ = x_0 + 10 S_0 \quad (16)$$

Em que, x_0 é a média aritmética do teor medido de uma série de brancos (entre 10 a 20 ensaios) e S_0 representa o desvio padrão associado a x_0 .

- A partir do método de mínimos quadrados da reta de calibração, admitindo-se que o desvio-padrão da estimativa ($S_{y/x}$) representa o desvio padrão do branco, através das equações (17) e (18).

$$LD = \frac{3,3 S_0}{declive} \quad (17)$$

$$LQ = \frac{10 S_0}{declive} \quad (18)$$

3.3.6 – Precisão

A precisão é um termo geral que pretende avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos sobre a mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas.

A precisão está associada à existência de erros aleatórios, ou seja, de erros que ocorrem sempre de forma diferente, com valor e sentido imprevisível. É importante salientar que será mais realista estudar preferencialmente a precisão sobre amostras, para minimizar efeitos da matriz.

A precisão pode ser quantificada através do desvio padrão, ou de outros parâmetros estatísticos para a dispersão de valores: coeficiente de variação, erro relativo, variância, amplitude, entre outros. O valor da precisão, no entanto, será diferente consoante as condições em que as medições são feitas.

O coeficiente de variação é calculado através da equação (19).

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} \times 100 \quad (19)$$

Em que, \bar{X} é a média aritmética do teor medido de uma série de padrões e S representa o desvio padrão associado à \bar{X} .

O erro relativo é calculado pela equação (20).

$$\text{Erro relativo} = \left(\frac{\text{Valor medido} - \text{Valor Verdadeiro}}{\text{Valor Verdadeiro}} \right) \times 100 \quad (20)$$

Existem duas medidas extremas para avaliar, esta dispersão, designadas, por repetibilidade e reprodutibilidade. Entre estas duas medidas extremas de precisão existe uma situação intermédia que se designa precisão intermédia.

A repetibilidade exprime a precisão de um método de ensaio efetuado em condições idênticas, isto é, refere-se a ensaios efetuados sobre uma mesma amostra, em condições tão estáveis quanto possível, tais como, mesmo laboratório, analista, equipamento e reagentes em curtos intervalos de tempo.

Para determinar a repetibilidade de um método no próprio laboratório, efetuam-se uma série de medições ($n \geq 10$) sobre uma mesma amostra ou padrões, em condições de repetibilidade.

A reprodutibilidade é a precisão interlaboratorial, ou seja, o grau de concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos.

Embora a reprodutibilidade não seja um componente de validação de método executado por um único laboratório, é considerada importante quando um laboratório procura a verificação do desempenho dos seus métodos em relação aos dados de validação obtidos através de comparação interlaboratorial.

A precisão intermédia refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas definindo exatamente, quais as condições a variar (uma ou mais), tais como, diferentes analistas, equipamentos e épocas, com ou sem verificação da calibração.

Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados num laboratório e, como tal mais aconselhável de usar.

Para determinar a precisão intermédia de um método, efetuam-se n medições em duplicado ou em ensaio único, sobre a amostra, nas condições pré-definidas, pois existem vários métodos para estudar este tipo de precisão.

3.3.7 – Exatidão

Exatidão do método é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceite como convencionalmente verdadeiro. Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são, entre outros: uso de materiais de referência, participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação.

A exatidão, quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, implica numa combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos. A determinação da tendência total com relação aos valores de referência apropriados é importante no estabelecimento da rastreabilidade aos padrões conhecidos. A tendência pode ser expressa como recuperação analítica, definida como *valor observado / valor esperado*.

Esta tendência deve ser corrigida ou demonstrada ser desprezível, mas em ambos os casos, a incerteza associada com a determinação da tendência permanece com um componente essencial da incerteza global. Sempre que possível, os materiais de referência certificados (MRC) devem ser utilizados no processo de validação de um método de ensaio. Um MRC possui um valor de concentração, ou outra grandeza, para cada parâmetro e uma incerteza associada.

Na avaliação da exatidão utilizando um material de referência, os valores obtidos pelo laboratório – média e desvio padrão de uma série de ensaios em duplicado – devem ser comparados com os valores certificados do material de referência. Para esta comparação podem ser utilizados diversos critérios de decisão, entre os quais; erro relativo, teste de hipóteses, índice z (z Score) e erro normalizado.

3.3.8 – Robustez

A robustez de um método de ensaio mede a sensibilidade que este apresenta face a pequenas variações. Um método diz-se robusto se revelar praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando esse está sendo executado.

Para determinar a robustez de um método de ensaio, pode-se recorrer ao teste de *Youden*. Trata-se de um teste que permite não só avaliar a robustez do método, como também ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma dessas variações. Convém salientar que quanto maior for a robustez de um método, maior será a confiança desse relacionamento à sua precisão [57-62].

Neste trabalho, efetuou-se a validação do método para a técnica de doseamento do iodo, em que foram avaliados os seguintes parâmetros; Especificidade/Seletividade, Gama de trabalho, Linearidade, Sensibilidade, Limites Analíticos do método de ensaio (limite de deteção e limite de quantificação) e Precisão (repetibilidade e precisão intermédia), que correspondem apenas à avaliação direta do método analítico.

3.4 - Procedimento da Determinação do Iodo

Colocaram-se cerca de 0,5 - 1,0 mg de amostra numa caixa de petri, resistente ao calor, com a solução de 10 % de sulfato de zinco (1,0 mL) e carbonato de sódio 2 N (2,0 mL).

A mistura foi colocada numa estufa termostática a 100 ± 5 °C para secar.

As amostras foram depois transferidas para uma mufla, onde foram calcinadas a 600 ± 10 °C, durante 1 h. Sendo depois colocadas à temperatura ambiente para arrefecerem.

Às amostras calcinadas foram adicionados 6,0 mL de água bidestilada, sendo de seguida centrifugadas numa centrífuga (Kubota Kn-70) durante 10 minutos a 700 g (ou 1800 rpm) e retirou-se 1,0 mL de sobrenadante posteriormente.

Em simultâneo prepararam-se as soluções padrão, à solução de iodeto de potássio preparada previamente, retiraram-se as quantidades de 0, 1, 3, 5, 7 e 9 mL e colocaram-se em tubos de ensaio, para uma gama de concentrações de trabalho de 0 - 0,45 mg/L e para uma gama de concentrações de 0 - 0,09 mg/L, retiraram-se os respetivos volumes de 0; 0,01; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08 e 0,09 mL.

De seguida, as amostras e padrões tiveram o mesmo procedimento, em que, foi adicionado 2,0 mL da solução de arsénio III. O conjunto foi arrefecido durante 10 minutos, após uma mistura completa, em gelo a 4 °C.

Em seguida, 2,0 mL da solução cério IV foi adicionado (previamente colocada em gelo) e, após a mistura, o conjunto foi aquecido num banho a $40 \pm 0,1$ °C.

Passados 20 minutos, as soluções foram colocadas novamente num banho de gelo a 4 °C, durante 10 minutos.

No final, foi adicionado 0,5 mL de ácido difenilamina - 4 - sulfónico a cada tubo e, após mistura, a solução foi medida num espectrofotómetro a 430 nm, este processo foi sucessivamente repetido para todas as amostras e padrões em estudo [51-55].

3.5- Método da Extração Sequencial

Para a especiação em amostras sólidas, deve ser aplicado um método de extração sequencial ou seletivo. Um elemento pode estar presente num sólido sob a forma de espécies adsorvidas na superfície, coprecipitadas, ocluídos ou compostos de coordenação.

A maioria dos esquemas de extração sequencial inclui diferentes grupos de extratores, já que ela se baseia na progressão de extratores fracos, como a água, até um extrator forte, como um ácido concentrado. Os primeiros extratores da extração sequencial geralmente são aqueles com capacidade de troca iónica, deslocando iões de locais iónicos específicos, sendo representados por soluções iónicas, como o cloreto de magnésio e de cálcio e nitrato de sódio.

Em seguida, são utilizados extratores com propriedades de dissolução de carbonatos, já que os metais ligados a carbonatos são sensíveis à variação de pH. Estes são representados por soluções tampão de ácido/acetato de amónia pH=0,5.

Os extratores com propriedades de redução ácida continuam o processo de extração e promovem a dissolução de oxihidratos de ferro e manganês, tendo como exemplo a solução diluída de ácido acético.

Por fim, dois últimos tipos de extratores são utilizados: primeiro aqueles que enfraquecem a ligação do metal com compostos orgânicos e sulfuretos, representados por soluções ácidas de peróxido de hidrogénio, soluções de hidróxido de sódio pH=12,0 e ácido clorídrico pH=2,0; pois permitem uma degradação da matéria orgânica, por hidrólise ou oxidação, facilitando a libertação dos metais e, por último são utilizados os extratores que promovem a dissolução dos silicatos e minerais, representados por ácidos fortes.

Um método de especiação ideal é definido como aquele que pode fornecer informações desejáveis, sem alterar a amostra original em momento algum [48-50].

3.6- Procedimento da Extração Sequencial

Foram utilizadas inicialmente cerca de 5, 10, 20 e 30 g de amostra seca e cada amostra passou pelo processo de extração sequencial.

Os extractores utilizados foram: Solução de CaCl_2 (1,0 M), Solução de CH_3COOH (0,1 M), Solução de CH_3COOH (0,5 M) / Solução de $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (5 %) => pH=5,0, Solução de NaOH (0,1 M) e Solução de HCl (0,5 M).

Cada extractor esteve em contacto com a amostra durante 1 hora, sendo depois filtrado, e este utilizado para determinação do teor total dos vários metais em estudo [48-50].

3.7 - Método da Espectroscopia de Absorção Atómica

Espectroscopia é um termo que descreve um conjunto de radiações eletromagnéticas em que o comprimento de onda da radiação é dado em função da intensidade da radiação emitida ou absorvida.

O eletrão é uma partícula que possui uma certa energia, e pode emitir energia radiante, dando origem a um espectro de emissão, ou pode absorver energia de qualquer tipo (elétrica, térmica ou radiante), dando origem a um espectro de absorção.

A espectroscopia de absorção atómica trata do estudo da absorção da energia radiante nas zonas do visível e ultravioleta por átomos neutros no estado gasoso.

3.7.1 - Atomização

A atomização ocorre quando a solução do elemento em estudo é vaporizada numa chama, dispondo-se uniformemente em pequeninas gotas e constituindo o que se pode chamar um aerossol. Os átomos livres na chama podem ser provenientes da dissociação direta do sal, ou podem formar-se a partir de compostos intermediários do metal com outras espécies existentes na amostra, ou nos gases da chama.

Quando se introduz uma amostra líquida, ou sólida, numa câmara de grafite, sobe-se primeiro a temperatura de modo a remover, tanto quanto possível, as substâncias presentes antes que o elemento em estudo seja dissociado termicamente em átomos.

Deste modo, a maior parte da amostra e o solvente são separados antes da atomização do elemento a analisar, não tendo assim um efeito interferente como acontece na chama. A introdução direta de volumes fixos da amostra na câmara de grafite faz com que as propriedades físicas, tais como a viscosidade, tensão superficial e densidade, se tornem sem efeito.

O tempo de atomização é da maior importância pois que a densidade máxima da nuvem atómica (e portanto a maior sensibilidade) só se consegue obter quando o tempo de atomização é menor do que a permanência dos átomos na câmara de grafite. Como este tempo é só de alguns décimos de segundo, a atomização deverá ser ainda menor.

Depois da injeção da amostra o solvente é geralmente vaporizado, devendo usar-se uma temperatura e um intervalo de tempo tal que se dê a separação do solvente quantitativamente, mas não dum modo muito lento. Certos componentes de pontos de ebulição elevados como os ácidos devem ser removidos de forma semelhante num segundo programa de temperatura.

Se a matriz for suficientemente removida no pré-tratamento térmico, o elemento pode normalmente ser determinado sem interferências. Se a separação não se puder efetuar, ou só se der parcialmente devido à alta volatilidade do elemento em estudo, devem usar-se outros métodos para reduzir as interferências a um nível aceitável.

Na câmara de grafite a desvantagem dum pulverização insuficiente é evitada porque a amostra é introduzida diretamente na câmara, aumentando por outro lado o tempo de estadia dos átomos no percurso luminoso em relação à chama, para a mesma velocidade de atomização.

3.7.2 - Mecanismo de absorção

Se fizer incidir sobre os átomos neutros dum elemento, no estado de vapor atómico, radiação na zona do visível ou ultravioleta e com a frequência característica do elemento considerado, então os átomos neutros livres do elemento são capazes de absorver essa radiação.

Os átomos excitados voltam ao estado inicial de energia, parcialmente, por emissão à mesma frequência. De facto, quando um tal vapor é iluminado por um feixe de energia radiante apropriado, o átomo no estado fundamental absorve um fóton e a energia deste produz uma transmissão eletrónica.

Como cada átomo tem os seus níveis de energia bem definidos, somente podem ser absorvidos fótons de determinada frequência, o que corresponde a determinados comprimentos de onda.

Em relação ao comprimento de onda, uma vez selecionadas as melhores condições para traçar o espectro de absorção, deve traçar-se este a fim de localizar o comprimento de onda de absorção máxima. As medições de absorvência, para fins analíticos, são quase sempre feitas ao comprimento de onda do máximo de absorção.

3.7.3 - Lei de Lambert-Beer

Em fotometria de chama de absorção atômica o feixe de radiação passa através de uma chama que contém os átomos absorventes. Este meio atua como se fosse a célula absorvente, de espessura definida, em espectrofotometria do visível e ultravioleta (flutuações na chama produzem pequenas variações na espessura).

Admitindo que todos os átomos existentes no meio atômico absorvente estão na forma neutra e no estado fundamental e ainda que não há efeitos de dispersão, este método utiliza a Lei de Lambert-Beer, que se traduz pela equação (21).

$$A = abc \quad (21)$$

Onde o coeficiente a ($\text{mol}^{-1} \text{L cm}^{-1}$) é conhecido como absorvidade e tem um valor característico para cada elemento e cada conjunto de parâmetros instrumentais, entre os quais o comprimento de onda. O valor de b (cm), corresponde à largura do feixe. O valor de c (mol L^{-1}) é a concentração do elemento no meio absorvente (que é proporcional ao número de átomos presentes na amostra), desde que se mantenham fixas a frequência, a pressão, temperatura e espessura do meio absorvente. Por outro lado, é preciso notar que o valor de c refere-se à concentração dos átomos na chama, ou seja, a sua pressão parcial. Este valor é proporcional à concentração da solução aspirada através do valor do caudal de aspiração.

3.7.4 - Aparelhagem

Um aparelho para absorção atômica tem as mesmas componentes básicas que um espectrofotómetro para medir absorção de soluções, sendo as principais diferenças a fonte e a célula de absorção. Do mesmo modo podem-se usar aparelhos de feixe simples e duplo com as mesmas vantagens e desvantagens dos espectrofotómetros do visível e do ultravioleta.

3.7.5 - Fontes para absorção atómica

Como as riscas em absorção atómica são muito estreitas e as transições são únicas para cada elemento, a absorção atómica é altamente específica. Como a lei de Beer se aplica só a radiação monocromática e esta não se consegue na prática, aquela lei só se pode aplicar se a largura da banda seleccionada for estreita em relação à largura do pico de absorção, para que as absorvidades se mantenham aproximadamente constantes naquela gama.

Nenhum monocromador é capaz de seleccionar uma banda tão estreita como a necessária para a absorção atómica. Assim, quando se usa uma fonte de radiação contínua e um monocromador, só uma pequena fração da radiação emergente é do comprimento de onda absorvido e a variação relativa na intensidade da banda emergente é pequena em relação à incidente. É necessário arranjar uma fonte que emita a risca de ressonância do elemento em estudo com uma largura consideravelmente menor do que a largura da risca de absorção e com intensidade de radiação e estabilidade suficientes para permitir medidas exatas de absorção. Isto é possível com as lâmpadas de cátodo-oco, descarga de vapor, multielementos e as de descarga sem eléctrodos. As utilizadas neste trabalho foram as de cátodo-oco.

Os componentes ativos são o cátodo, feito ou revestido do elemento em estudo, geralmente na forma de um cilindro fechado numa extremidade com 1 cm de profundidade e 1 cm de diâmetro e um ânodo constituído meramente por um fio metálico.

A lâmpada é cheia com um gás, néon ou árgon, a uma pressão de alguns mm Hg. Escolheram-se estes gases pois não reagem com o metal do cátodo e apresentam espectros de emissão muito simples.

Quando a corrente passa, dá-se uma descarga eléctrica que provoca a ionização do gás raro, os iões resultantes bombardeiam o cátodo que emite os átomos do metal. O vapor atómico do metal é por sua vez excitado por colisões com átomos do gás raro e emite a sua radiação característica. A escolha do gás que enche a lâmpada depende do elemento.

A intensidade de corrente eléctrica usada nas lâmpadas de cátodo-oco varia entre 5 e 100 mA e a tensão de 100-200 volts.

Acima do valor máximo indicado para a lâmpada, os cátodos estão em perigo de destruição, mas abaixo desse máximo a emissão da lâmpada aumenta com a intensidade de corrente melhorando a razão sinal/ruído.

3.7.6 - Tipos de chama utilizados em absorção atómica

Quase todas as chamas convencionais têm sido experimentadas em absorção atómica. Para os elementos que se vaporizam facilmente em chamas de temperatura baixa, poucas são as vantagens das chamas oxigénio/hidrogénio, oxigénio/acetileno, ou oxigénio/cianogénio, sendo antes vantajosa a chama ar/acetileno.

A chama de ar/gás natural tem sido largamente usada e pertence à classe das chamas de baixa temperatura, tal como a chama de ar/propano que tem a vantagem sobre a chama de ar/acetileno de produzir menor emissão de fundo e não necessitar de queimadores de tipo especial.

O uso do oxigénio ou óxido nitroso, em vez de ar, aumenta a temperatura da chama, o que é particularmente útil para elementos que formam compostos que não se dissociam a temperaturas baixas. No entanto, a chama mais utilizada em absorção atómica é a de ar/acetileno. Com efeito, para a maioria dos elementos tem uma temperatura apropriada para a sua atomização, só nalguns casos ocorrendo a ionização.

A chama é completamente transparente numa larga gama espectral, além de que a sua emissão é baixa. Normalmente, esta chama é usada com os gases numa relação próxima da estequiometria, ou fracamente oxidante, podendo no entanto usar-se razão combustível/comburente noutras gamas, o que aumenta a sua aplicabilidade.

Neste trabalho utilizaram-se chamas ricas em gás combustível (ar/acetileno), dá-se este nome às chamas que são produzidas com um fluxo de gás combustível elevado, de modo que a chama é muito luminosa, altamente redutora, razoavelmente calorífica e rica em matérias incandescentes. Embora, se tenham usado, em absorção atómica, chamas de baixas temperaturas, de um modo geral são necessárias chamas de maior poder calorífico para facilitar a dissociação de alguns compostos. Assim a chama de ar/acetileno (mais quente) é mais vantajosa que a de ar/gás natural. As chamas ricas em combustível produzem um deslocamento do equilíbrio da dissociação dos óxidos metálicos a favor da concentração do metal no estado atómico.

3.7.7 - Sistema de atomização

O atomizador, juntamente com o queimador, é uma das partes principais do sistema de emissão. Deve introduzir a amostra líquida na chama com uma velocidade estável e reprodutível. Não deve ser atacado por soluções corrosivas e deve limpar-se facilmente. Os atomizadores podem ser classificados como os que introduzem o aerossol numa câmara de condensação para remover as gotas maiores e os que introduzem o aerossol diretamente na chama.

Só deve atingir a chama aerossol muito fino e este consiste normalmente no meio gasoso de difusão (contendo vapor de água) e finas gotas da solução; esta mistura deve ser evaporada e volatilizada rapidamente na chama. Para preparar o aerossol usa-se geralmente ar ou oxigénio e este último será também necessário para alimentar a chama no queimador.

O aerossol assim preparado é misturado com o gás combustível no interior do próprio queimador ou na sua extremidade de saída.

Exceto nos modelos em que o queimador e o atomizador formam uma unidade, o atomizador é sempre um sistema separado comunicando com o queimador. O sistema de atomização pode ser subdividido em várias partes fundamentais: pulverizador, câmara de atomização, câmara de condensação, sistema de drenagem (escoamento) e sistema para introdução da amostra. O pulverizador que se usa nos espectrofotómetros mais vulgares é de sucção e a amostra sobe no recipiente em que está contida para a câmara de condensação.

3.7.8 - Queimador

O principal requisito de um queimador é que produza uma chama tranquila, quando se fornece combustível e oxigénio, ou ar, a pressão constante. A construção do queimador baseia-se nos mesmos princípios que os do queimador vulgar do laboratório, consistindo a única diferença em que o ar, ou oxigénio, é introduzido sob pressão em vez de ser só pela ação do gás combustível. Entre os diferentes modelos usados em fotometria de chama podem distinguir-se dois tipos principais de queimadores: queimadores não atomizadores e queimadores atomizadores.

Os queimadores não atomizadores, são os tipos mais simples que usam um sistema atomizador externo e são assim designados porque o combustível e a mistura amostra/ar ou amostra/oxigénio são feitas separadamente. O aerossol deve ser produzido no atomizador antes de alcançar o queimador, que está ligado à câmara de atomização ou condensação.

Os tipos mais simples de queimadores não atomizadores consistem num tubo de metal, ou vidro, com um estrangulamento no meio, ou parte inferior da câmara de atomização, para facilitar a mistura dos gases com o aerossol. O “spray” entra na parte inferior da câmara de atomização e sobe perfeitamente misturado com a corrente de gases para a chama.

Nos queimadores atomizadores, a unidade conhecida como queimador dispensa um atomizador separado e não necessita de uma câmara de atomização, ou câmara de condensação. Estes modelos são caracterizados por formarem simultaneamente a mistura do aerossol e do combustível na extremidade do queimador.

Dentro deste tipo de queimadores, o mais moderno é o de tipo Beckman, que pode ser de metal, ou vidro, e em que o atomizador e o queimador estão acoplados conjuntamente sem arrefecimento. A corrente de oxigénio provoca a atomização por sucção e o aerossol sai concêntricamente com o fluxo de gás combustível. Os modernos queimadores metálicos de tipo Beckman são de dois tipos: um para o hidrogénio/oxigénio e outro para acetileno/oxigénio. Diferem principalmente na forma da extremidade superior e tamanho do tubo de saída. Se o queimador preparado para o uso de hidrogénio é usado, por engano, num aparelho alimentado por acetileno pode causar obstrução do tubo capilar devido a depósitos de carbono e mesmo deterioração, por fusão dos terminais do queimador.

3.7.9 - Aplicações em análises quantitativas

A absorção atómica, seja por atomização por chama seja por atomização termoelétrica, é largamente utilizada para determinar vestígios de metais em amostras cujas matrizes são complexas.

Para desenvolver um método quantitativo de absorção atómica deve ter-se em conta vários parâmetros: escolha do processo de atomização, seleção do comprimento de onda, largura da fenda, preparação da amostra, minimização das interferências espectrais e químicas e seleção do método de padronização.

3.7.10 - Avaliação do método

Para avaliar um método devem ter-se em conta vários parâmetros, como;

- a) Escala operativa – neste método, a partir de qualquer dos tipos de atomização consegue-se limites de deteção muito baixos, o que faz com que a escala operativa seja larga.
- b) Rigor – de um modo geral, quando se consegue eliminar as interferências atinge-se um rigor entre 0,5-5 %. No entanto, dentro desta escala de valores, são conseguidos melhores valores de rigor quando a atomização é feita por chama.
- c) Precisão – para valores de absorvência superiores a 0,1-0,2 o desvio padrão relativo é 0,3-1 % para a atomização por chama, e 1-5 % para a atomização termoelétrica.
- d) Sensibilidade – na atomização por chama a sensibilidade é influenciada pela composição da chama e a posição, na chama, da espécie absorvente. Normalmente otimiza-se a sensibilidade, aspirando um padrão para a chama e ajustando condições operativas, tais como razão combustível-comburente, velocidade do caudal de nebulização, altura do queimador, de modo a obter o maior valor possível de absorvência. Na atomização termoelétrica a sensibilidade é influenciada pelos passos que precedem a atomização, como sejam a secagem e a eliminação da matéria orgânica. Independentemente do tipo de atomização a sensibilidade é condicionada pela matriz da amostra.
- e) Seletividade – devido à pequena largura da banda das linhas de absorção, o método de absorção atómica é muito seletiva. Devido à sua elevada seletividade este método pode ser utilizado para a determinação de mais de 60 elementos.
- f) Tempo necessário para a realização das análises – é requerido pouco tempo para realizar as análises, principalmente quando a atomização é por chama [63,64].

Dados importantes utilizados no método de espectroscopia de absorção atómica, para necessária calibração do aparelho segundo os metais em estudo, estão apresentados na tabela 3.1.

Determinação de Iodo e de Metais Pesados em Vegetais Bociogénicos

Tabela 3.1 – Dados utilizados no método de espectroscopia de absorção atómica [51].

	Cobre	Manganês	Selénio	Zinco
Comprimento de onda (nm)	324,8	279,5	196,0	213,9
Limite de deteção (mg/L)	0,01	0,01	nd	0,005
Sensibilidade (mg/L)	0,1	0,05	0,33	0,02
Intervalo ótimo de concentração (mg/L)	0,2-10	0,1-10	nd	0,05-2
Chama	Ar/acetileno			
Temperatura de otimização (revestido/não revestido)	2400	2500	2400	1400
	2700	2700	2700	1600
Corrente da lâmpada (mA)	5	12	6	10

nd - não defenido



Figura 3.1 – Espectrofotómetro de absorção atómica de chama, utilizado no trabalho experimental.



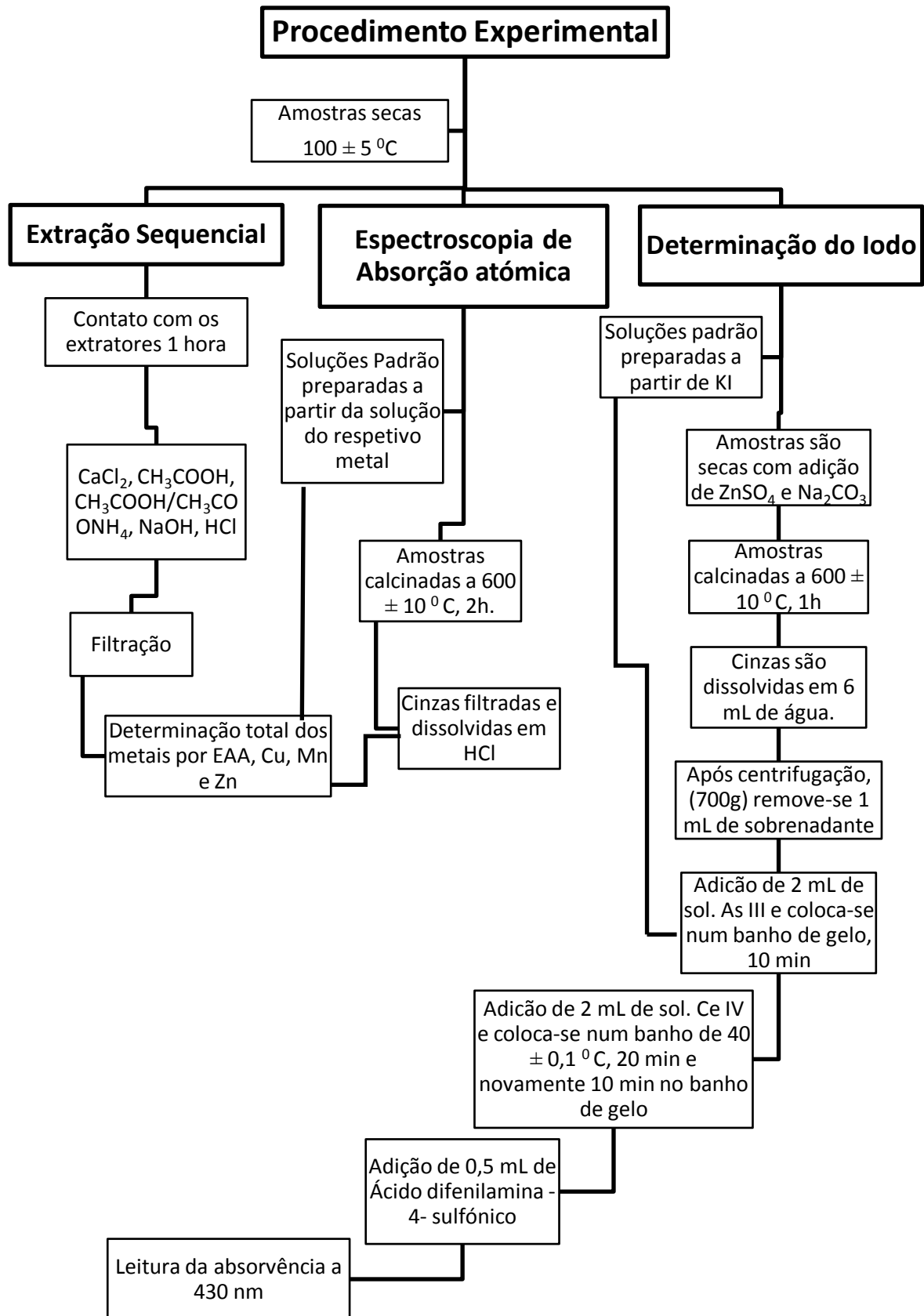
Figura 3.2 – Lâmpadas de cátodo – oco, de cobre, manganês e zinco.

3.8– Procedimento da Espectroscopia de Absorção Atómica

Prepararam-se soluções padrão, com os seguintes valores de concentração de 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 M, correspondentes ao intervalo ótimo de concentração de cada metal em estudo. Após a dissolução das cinzas das respetivas amostras, provenientes do litoral e interior, em HCl, estas foram lidas no aparelho de espectroscopia de absorção atómica, marca Philips, consoante os metais em estudo, cobre, manganês e zinco.

Relativamente à determinação do selénio, esta foi feita na Universidade Nova de Lisboa, visto que o aparelho de espectroscopia de absorção atómica, utilizado para a determinação dos restantes metais não permitia a análise. As amostras foram portanto guardadas ao longo de todo o trabalho, e no final foram enviadas para a respetiva leitura [51].

3.9 - Esquema do Procedimento Experimental



Capítulo 4 - Resultados e Discussão

Capítulo 4 - Resultados e Discussão

Neste trabalho, foram desenvolvidos métodos analíticos para a determinação do iodo nas amostras vegetais, pertencentes à espécie *Brassicaceae Napus* (nabo), provenientes da zona litoral e interior de Portugal, com base na reação de Sandell-Kolthoff, pela técnica de espectroscopia, no entanto com pequenas alterações, e determinação de alguns metais (Cobre, Manganês e Zinco), através da técnica de espectroscopia de absorção atómica, nas mesmas amostras.

4.1 – Determinação do Iodo

No início do trabalho a gama de valores de concentração estipulados foi entre 0 e 0,45 mg/L, tendo-se obtido os resultados apresentados na tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Valores de concentração dos padrões, absorvências e respetiva média, desvio padrão (DP) e variância.

Conc. (mg/L)	Absorvência				Média	DP	Variância	
	Padrões	Leitura 1	Leitura 2	Leitura 3				Leitura 4
0		1,085	1,078	1,053	1,09	1,077	0,016	0,00027
0,05		0,887	0,875	0,864	0,879	0,876	0,010	0,00009
0,15		0,643	0,64	0,625	0,638	0,637	0,008	0,00006
0,25		0,503	0,499	0,505	0,498	0,501	0,003	0,00001
0,35		0,413	0,411	0,406	0,403	0,408	0,005	0,00002
0,45		0,354	0,346	0,344	0,34	0,346	0,006	0,00003

De acordo com os valores obtidos, traçou-se a respetiva curva de calibração, apresentada na figura 4.1.

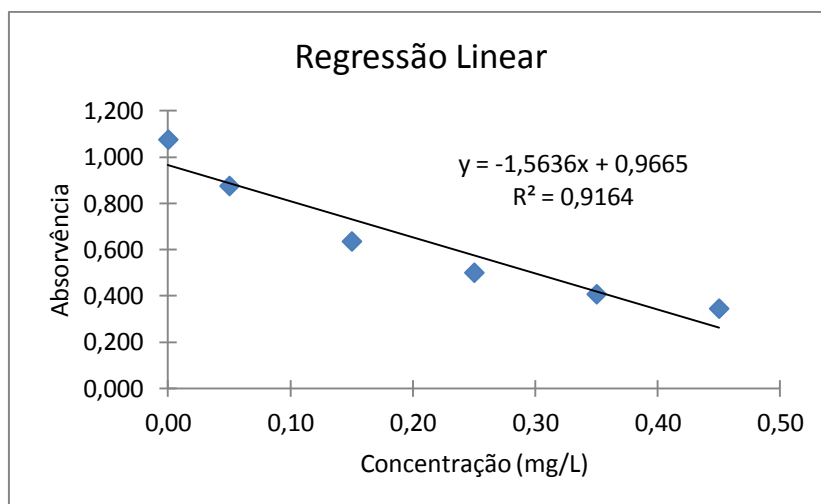


Figura 4.1 – Curva de calibração, utilizando regressão linear.

Observando a figura 4.1, é possível verificar que o traçado dos pontos, tem uma trajetória curvilínea, e o valor do coeficiente de correlação é muito baixo, sendo assim, procedeu-se ao mesmo traçado, mas utilizando regressão polinomial.

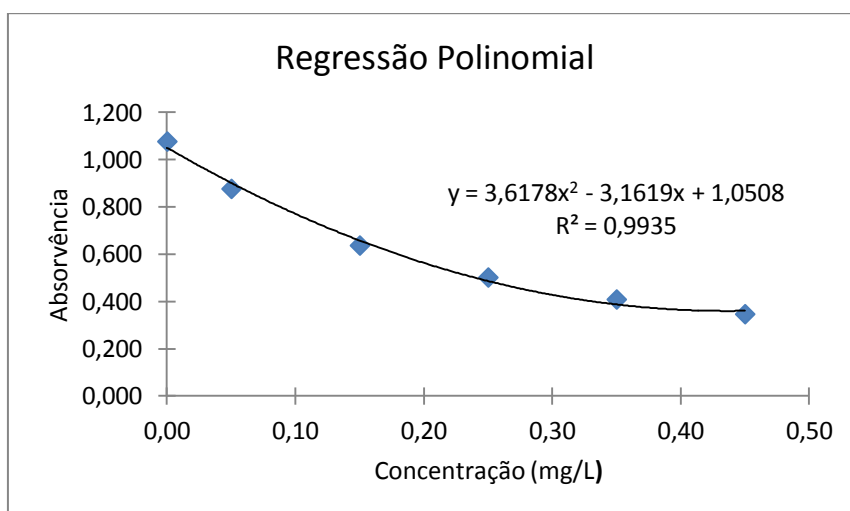


Figura 4.2 – Curva de calibração, utilizando regressão polinomial.

Como se analisa na figura 4.2, utilizando a regressão polinomial, obtém-se um coeficiente de correlação significativo. Como os resultados obtidos não obedecem à Lei de Beer, visto não existir uma proporcionalidade direta entre os valores de concentração e absorvência, o ideal foi ajustar a gama de concentrações a utilizar no trabalho experimental, para isso, foi necessário analisar mais em detalhe alguns pontos, que se apresentam na tabela 4.2, correspondentes a 0,16 e 0,18 mg/L.

Determinação de Iodo e de Metais Pesados em Vegetais Biogénicos

Tabela 4.2 – Valores de concentração dos padrões e respetivas absorvências (Abs).

	Conc. (mg/L)	Abs
Branco	0	1,077
Padrão	0,05	0,876
	0,15	0,637
	0,16	0,616
	0,18	0,581
	0,25	0,501
	0,35	0,408
	0,45	0,346

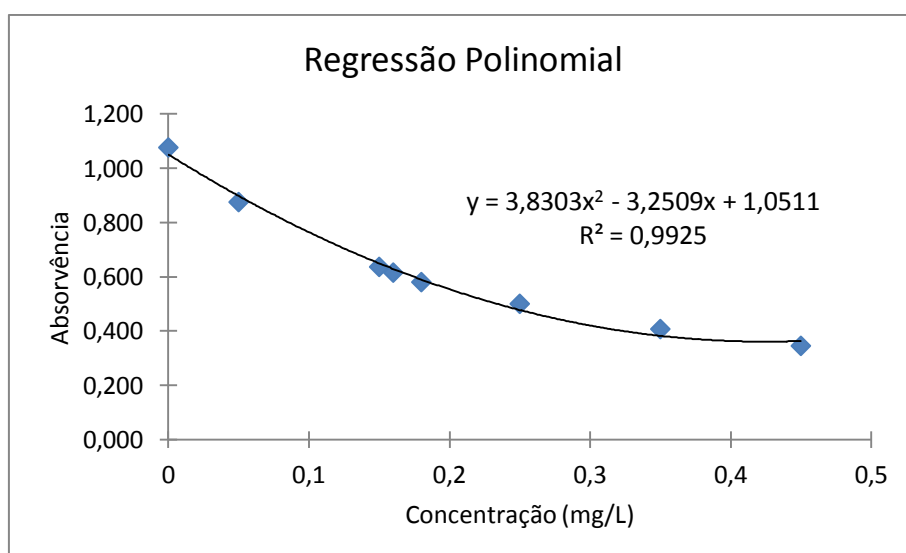


Figura 4.3 – Curva de calibração, utilizando regressão polinomial, com adição de novos pontos.

Como se pode observar na figura 4.3, mantendo a regressão polinomial, verifica-se que a reta de calibração apenas pode ser linear até 0,1 mg/L.

Sendo assim, foi possível ajustar a nova gama de trabalho, que passou a ser entre 0 e 0,1 mg/L.

Relativamente às amostras, foram feitas várias leituras em duplicado, com amostras de *Brassicaceae Napus* (nabo) provenientes do litoral e interior.

Determinação de Iodo e de Metais Pesados em Vegetais Bociogénicos

Realizaram-se também, várias leituras dos padrões ajustados à nova gama de trabalho, sendo estes valores apresentados na tabela 4.3, valores de concentração e respetivas absorvências obtidas, correspondentes a uma média de 10 leituras. Estes valores permitiram obter a respetiva reta de calibração que permitiu calcular o correspondente valor de concentração das amostras.

Tabela 4.3 – Concentrações dos padrões e respetivos valores médios de absorvência (n=10).

Concentração (mg/L)	Absorvência
0	1,068
0,01	1,029
0,02	0,990
0,04	0,921
0,06	0,855
0,08	0,786
0,09	0,759

A tabela 4.4 apresenta os valores obtidos na análise das amostras em duplicado (n=4). Verifica-se que não existe diferença nos valores de concentração entre as amostras do litoral e interior, sendo a média de valores obtida de 0,0533 mg/L e 0,0534 mg/L respetivamente.

Tabela 4.4 - Valores de absorvência, média dos valores de absorvência, desvio padrão e respetiva concentração das amostras do litoral e interior, analisadas.

Leituras	Abs Litoral	Média	DP	Conc. (mg/L)	Abs Interior	Média	DP	Conc. (mg/L)
1	$\frac{0,888}{0,879}$	0,884	0,006	0,052	$\frac{0,884}{0,889}$	0,887	0,004	0,051
2	$\frac{0,872}{0,875}$	0,874	0,002	0,055	$\frac{0,868}{0,876}$	0,872	0,006	0,056
3	$\frac{0,874}{0,883}$	0,879	0,006	0,054	$\frac{0,855}{0,881}$	0,868	0,018	0,057
4	$\frac{0,884}{0,883}$	0,884	0,001	0,052	$\frac{0,899}{0,881}$	0,890	0,013	0,050

4.2 – Validação do Método da Determinação do Iodo

Para validar um método analítico há vários parâmetros a ter em conta, de forma a garantir que esse método permita demonstrar, com grau de confiança elevado, que o processo analítico usado é adequado para o fim a que se destina. A validação do método foi efetuada na determinação do iodo.

Existem documentos especialmente concebidos para efeitos de validação, neste trabalho foram utilizadas as recomendações do Guia da Relacre [61].

4.2.1 – Especificidade / Seletividade

A avaliação da capacidade do método de distinguir os analitos das interferências presentes nas amostras foi feita através de ensaios de recuperação. Este teste consistiu na adição de uma quantidade conhecida de analito à amostra a analisar e no cálculo da percentagem de recuperação relativamente à quantidade adicionada. A recuperação é calculada de acordo com a equação (3).

Na tabela 4.5 são apresentados os valores obtidos nas amostras do litoral e interior. As percentagens de recuperação obtidas situam-se no intervalo de 95 a 104 %. Deste modo os valores de recuperação obtidos permitem evidenciar uma boa especificidade e seletividade da técnica analítica desenvolvida, visto permitirem discriminar o analito relativamente a outras substâncias eventualmente presentes na amostra.

Tabela 4.5 – Percentagens de recuperação obtidas para as amostras do litoral e do interior.

Amostra	Conc. Amostra (mg/L)	Conc. Padrão Adicionado (mg/L)	Conc. Amostra + Padrão (mg/L)	Recuperação (%)
Litoral	0,051	0,02	0,0710	99,8
			0,0707	98,4
			0,0708	99,1
			0,0701	95,4
			0,0714	102,0
			0,0713	101,3
			0,0713	101,3
			0,0704	96,9
			0,0713	101,3
Interior	0,051	0,02	0,0705	97,6
			0,0707	98,4
			0,0713	101,3
			0,0717	103,5
			0,0713	101,3
			0,0717	103,5
			0,0701	95,4
			0,0717	103,5
			0,0714	102,0

4.2.2 – Gama de Trabalho

A gama de trabalho utilizada foi constituída por uma série de 7 padrões, incluindo o branco, entre os 0 e 0,09 mg/L (0; 0,01; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08 e 0,09 mg/L). Para avaliar a gama de trabalho escolhida foi efetuado o teste de homogeneidade de variâncias de modo a verificar se existe diferenças significativas entre estas.

Foi realizado o teste PG, que consistiu em analisar a variância de 10 réplicas do primeiro e do último padrão (tabela 4.6) da reta de calibração. Sendo calculado através da equação (4).

Tabela 4.6 – Valores de concentração (X_i) em mg/L e absorvência (Y_i) da reta de calibração efetuada para o iodo e respetivas réplicas do primeiro e último padrão.

X_i	$Y_{i,1}$	$Y_{i,2}$	$Y_{i,3}$	$Y_{i,4}$	$Y_{i,5}$	$Y_{i,6}$	$Y_{i,7}$	$Y_{i,8}$	$Y_{i,9}$	$Y_{i,10}$
0,01	1,026	1,030	1,026	1,023	1,025	1,035	1,030	1,034	1,026	1,036
0,09	0,759	0,757	0,761	0,767	0,758	0,759	0,764	0,757	0,753	0,756

Tabela 4.7 – Valores correspondentes às variâncias do primeiro e último padrão da reta de calibração para o iodo, valor teste e valor da distribuição F de Snedecor/Fisher.

S_1^2 – Variância do primeiro padrão	$2,12 \times 10^{-5}$
S_{10}^2 – Variância do último padrão	$1,63 \times 10^{-5}$
PG – Valor teste	1,30
F – Valor tabelado da distribuição F com 99% de significância	5,35

Através dos resultados indicados na tabela 4.7 verifica-se que os valores obtidos através do teste de PG são inferiores ao valor tabelado da distribuição de F de Snedecor/Fisher, pelo que é possível verificar que as diferenças de variâncias determinadas não são significativas e a gama de trabalho está bem ajustada.

4.2.3 – Linearidade

Foi avaliada a linearidade para cada reta de calibração obtida através do teste de linearidade que consistiu na comparação estatística do valor teste PG com o valor tabelado da distribuição F de Snedecor/Fisher, e também através da análise gráfica da reta de calibração obtida e do respetivo coeficiente de correlação. O branco de calibração foi incluído na reta dado que era normalmente diferente de zero.

A figura 4.4, corresponde à representação gráfica da reta de calibração linear, com base nos valores apresentados na tabela 4.3. A tabela 4.8 indica os valores necessários ao cálculo do desvio padrão residual da função de calibração linear.

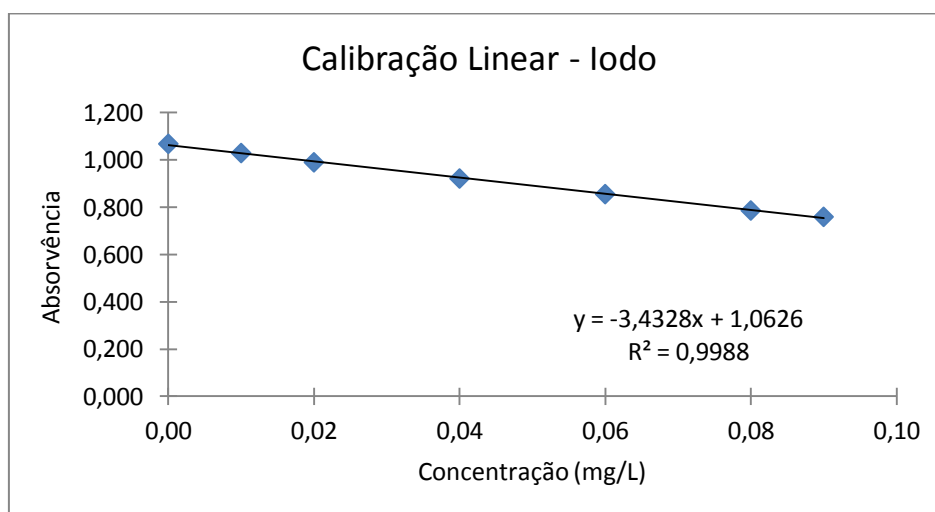


Figura 4.4 – Curva de calibração linear para o iodo.

Determinação de Iodo e de Metais Pesados em Vegetais Biogénicos

Tabela 4.8 – Valores necessários ao cálculo do desvio padrão residual da função de calibração linear.

X_i (mg/L)	Y_i	\hat{Y}_i	$Y_i - \hat{Y}_i$	$(Y_i - \hat{Y}_i)^2$
0	1,0681	1,0626	0,0055	0,000030
0,01	1,0291	1,0283	0,0008	0,000001
0,02	0,9898	0,9939	-0,0041	0,000017
0,04	0,9213	0,9253	-0,0040	0,000016
0,06	0,8553	0,8566	-0,0013	0,000002
0,08	0,7859	0,7880	-0,0021	0,000004
0,09	0,7591	0,7536	0,0055	0,000030

O desvio padrão residual da função de calibração linear calculado pela equação (6) é igual a 0,005 mg/L.

Ajustando um polinómio de segundo grau aos resultados da tabela 4.3, obtém-se a equação representada na figura 4.5. Os valores necessários ao cálculo do desvio padrão residual da função de calibração não linear são apresentados na tabela 4.9.

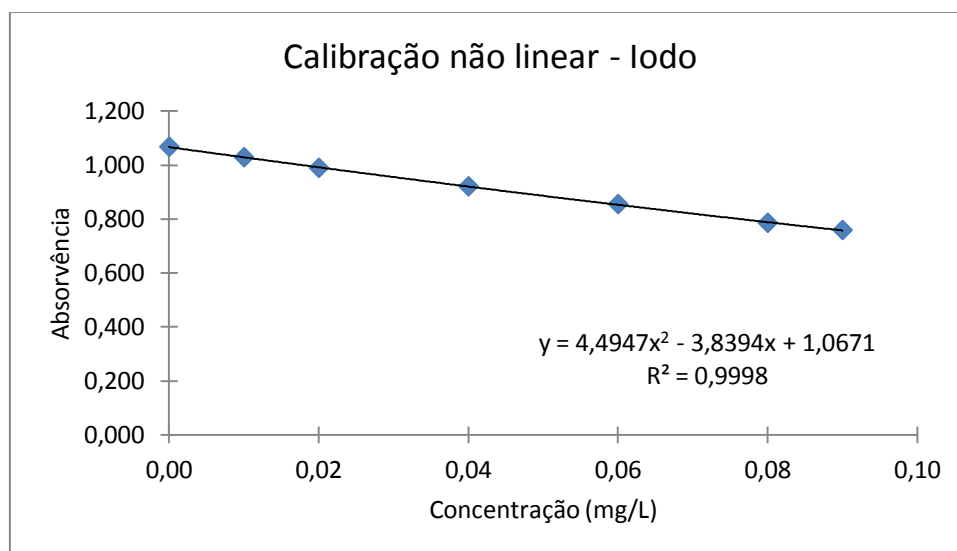


Figura 4.5 – Curva de calibração não linear para o iodo.

Determinação de Iodo e de Metais Pesados em Vegetais Bociogénicos

Tabela 4.9 – Valores necessários ao cálculo do desvio padrão residual da função de calibração não linear.

X_i (mg/L)	Y_i	\hat{Y}_i	$Y_i - \hat{Y}_i$	$(Y_i - \hat{Y}_i)^2$
0	1,0681	1,0671	0,0010	0,000001
0,01	1,0291	1,0292	-0,0001	0,000000
0,02	0,9898	0,9921	-0,0023	0,000005
0,04	0,9213	0,9207	0,0006	0,000000
0,06	0,8553	0,8529	0,0024	0,000006
0,08	0,7859	0,7887	-0,0028	0,000008
0,09	0,7591	0,7580	0,0011	0,000001

O desvio padrão residual da função de calibração não linear calculado pela equação (7) é igual a 0,002 mg/L.

Com os respetivos valores dos desvios das funções, obtém-se o valor de diferença de variâncias, calculado pela equação (13), igual a $7,82 \times 10^{-5}$ mg/L. E conseqüentemente o valor de PG, calculado pela equação (14) é igual a 14,51.

O valor tabelado de F da distribuição de Fisher/Snedecor para um grau de liberdade de $N-3 = 4$ é de 21,20 para uma probabilidade de 99 %, logo, o valor de PG calculado é inferior ao valor tabelado, pelo que a função de calibração é linear.

4.2.4 – Sensibilidade

Para o estudo da sensibilidade analisou-se os declives obtidos para cada reta, correspondentes a 3 leituras efetuadas em dias diferentes. De seguida são apresentados esses valores na tabela 4.10.

Tabela 4.10 – Declives das retas obtidas e sua equação.

Equação da reta	Coefficiente de Correlação (R^2)	Declive	Declive $\times (-1)$
$Y = -3,449X + 1,0599$	0,998	-3,449	3,449
$Y = -3,4144X + 1,0639$	0,998	-3,414	3,414
$Y = -3,4056X + 1,0608$	0,999	-3,406	3,406

Efetuuou-se o cálculo do coeficiente de variação (CV), através da equação (19), para isso foi necessário o cálculo da média (\bar{X}) e desvio padrão (DP) do valor dos declives, onde se obteve o valor de 3,423 e 0,023 respetivamente. O valor do coeficiente de variação obtido foi 0,67 %, sendo inferior a 10 %, desta forma, o desvio padrão em relação à média, tem um valor aceitável. Pelo valor do coeficiente de variação (CV) obtido, verifica-se que o desvio padrão em termos da média é pequeno ou seja, os valores são concordantes e mantêm-se ao longo do tempo.

4.2.5 – Limiares analíticos do método de ensaio

Os limites de deteção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados com base nas leituras dos valores dos brancos lidos ao longo de vários dias de trabalho e preparados de forma independente. Para o cálculo do LD e LQ foram utilizadas as equações (17) e (18), sendo os resultados obtidos de 0,014 mg/L e 0,042 mg/L respetivamente.

4.2.6 – Precisão

Foi feito o estudo da repetibilidade e da precisão intermédia de modo a avaliar a dispersão dos resultados entre ensaios independentes, repetindo um padrão com concentração conhecida.

Para a repetibilidade foi feita a leitura de um mesmo padrão, em sequências de 10 leituras. Ao valor das leituras obtidas, calcula-se a respetiva média e posteriormente o erro relativo. Os resultados obtidos apresentam-se na tabela 4.11.

Tabela 4.11 – Valores obtidos de % erro relativo para a repetibilidade.

Padrão (mg/L) Valor Verdadeiro	Absorvências	Média das Absorvências	Valor Medido	% ER
0,04	0,916	0,921	0,041	2,90
	0,918			
	0,918			
	0,930			
	0,929			
	0,920			
	0,920			
	0,917			
	0,929			
	0,916			

Determinação de Iodo e de Metais Pesados em Vegetais Biogénicos

Para o cálculo do erro relativo utilizou-se a equação (20) e obteve-se o valor de 2,9 %.

A precisão intermédia mostra o efeito que variações dentro do laboratório, como por exemplo diferentes analistas, equipamentos diferentes ou combinações de todos estes fatores entre si. Pode consistir no mesmo procedimento que a repetibilidade, só que efetuado em dias de trabalho diferentes ou não.

Para a precisão intermédia foram feitas leituras de três padrões, em sequências de 10 leituras. Ao valor das leituras obtidas, calcula-se a respetiva média e posteriormente o erro relativo. Os resultados obtidos apresentam-se na tabela 4.12. Utilizou-se a mesma equação (20) para calcular o erro relativo da repetibilidade, apresentado na tabela 4.13.

Tabela 4.12 – Valores de absorvência de vários padrões para a precisão intermédia.

Padrão (mg/L)	Absorvências									
0,02	0,994	0,985	0,992	0,986	0,990	0,998	0,993	0,987	0,986	0,987
0,06	0,847	0,851	0,852	0,869	0,859	0,853	0,856	0,859	0,861	0,846
0,08	0,780	0,781	0,787	0,791	0,786	0,794	0,789	0,783	0,786	0,782

Tabela 4.13 – Valores obtidos de % erro relativo para a precisão intermédia.

Padrão mg/L Valor verdadeiro	Média das Absorvências	Valor medido	% ER
0,02	0,990	0,021	6,04
0,06	0,855	0,060	0,65
0,08	0,786	0,081	0,76

Tanto no parâmetro de repetibilidade como no de precisão intermédia o valor de erro relativo associado foi sempre inferior a 10 %, o que demonstra uma boa precisão do método analítico.

4.3 - Extração Sequencial

Neste método foram necessárias amostras secas, para isso, foi essencial calcular o teor de massa seca e a respetiva % humidade, para confirmar a viabilidade das amostras em estudo, de acordo com os valores apresentados na tabela 4.14.

Tabela 4.14 – Registo dos valores de massa das amostras litoral e interior, antes e após secagem.

Amostras	Antes de secar		Após secagem	
	Litoral	Interior	Litoral	Interior
Massa (g)	5,411	5,374	0,425	0,339

Teor massa seca (litoral) = $(0,425 / 5,411) \times 100 = 7,85 \%$

Teor massa seca (interior) = $(0,339 / 5,374) \times 100 = 6,31 \%$

% Humidade (litoral) = $100 - 7,85 = 92,15 \%$

% Humidade (interior) = $100 - 6,32 = 93,68 \%$

De acordo com os valores obtidos, correspondentes a uma % humidade entre 92 e 94 % das amostras, foi viável prosseguir com o trabalho.

No método de extração sequencial, as amostras secas foram colocadas em contacto direto com os vários extratores, sendo possível observar uma coloração castanha, sendo esta tonalidade diferente à medida que se mudava de extrator e também que, quanto maior a quantidade de amostra, (5 a 30 g) maior essa tonalidade.

No final da extração, após a filtração, procedeu-se à determinação do teor dos metais Cobre, Manganês e Zinco, por Espectroscopia de Absorção Atómica. Durante a leitura, foi possível observar que as amostras continham muitos interferentes, devido à mudança de tonalidade da chama do aparelho de EAA. Deste modo, não foi possível continuar com este procedimento.

4.4 – Espectroscopia de Absorção Atómica

Neste procedimento, apenas se utilizaram as amostras que foram submetidas ao processo de calcinação, após secagem, e dissolvidas em HCl. A tabela 4.15 apresenta os valores obtidos.

Tabela 4.15 – Valores de absorvência e respetiva média, correspondente a cada padrão utilizado na EAA, para cada metal em estudo, Cobre, Manganês e Zinco.

Padrão/Conc (M)	Cobre		Manganês			Zinco		
	Abs	Média Abs	Padrão	Abs	Média Abs	Padrão	Abs	Média Abs
0,05	0,007	0,007	0,05	0,003	0,004	0,05	0,031	0,031
	0,006			0,004			0,031	
	0,007			0,004			0,031	
0,1	0,009	0,010	0,1	0,008	0,009	0,1	0,047	0,047
	0,01			0,009			0,048	
	0,01			0,009			0,047	
0,2	0,02	0,020	0,2	0,021	0,021	0,2	0,088	0,088
	0,021			0,02			0,089	
	0,019			0,02			0,088	
0,5	0,046	0,046	0,5	0,054	0,053	0,5	0,213	0,214
	0,047			0,053			0,214	
	0,046			0,053			0,214	
1	0,09	0,089	1	0,106	0,106	1	0,379	0,379
	0,089			0,106			0,377	
	0,089			0,105			0,381	
1,5	0,133	0,134	1,5	0,157	0,157	1,5	0,526	0,526
	0,133			0,157			0,525	
	0,135			0,156			0,527	
2	0,175	0,175	2	0,21	0,210	2	0,635	0,633
	0,175			0,209			0,632	
	0,176			0,21			0,633	
2,5	0,219	0,218	2,5	0,261	0,261	2,5*	0,713	0,715
	0,219			0,262			0,713	
	0,217			0,26			0,718	

*Valor rejeitado

De acordo com os valores apresentados na tabela 4.15, procedeu-se à construção das respetivas curvas de calibração, através do método estatístico de regressão linear.

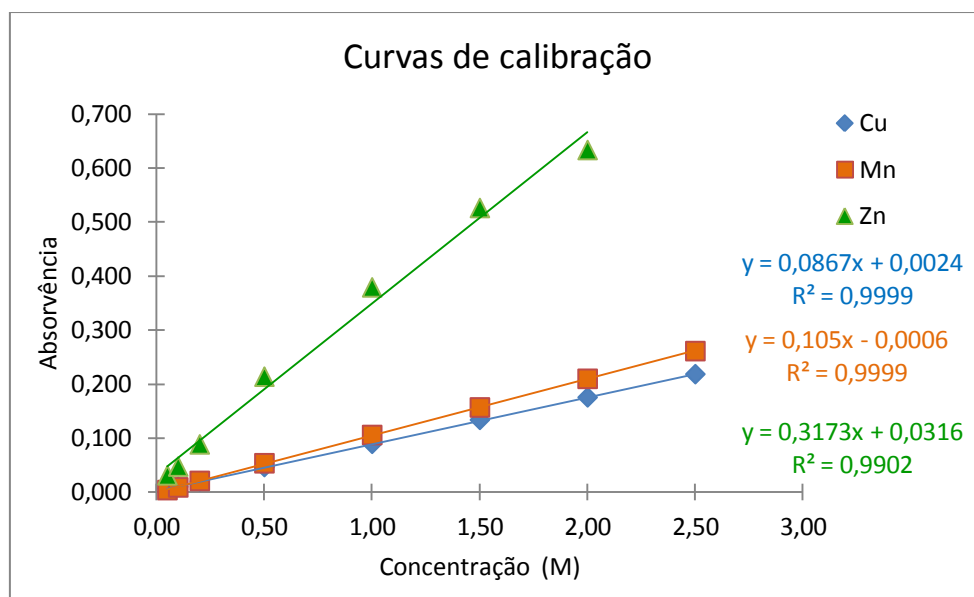


Figura 4.6 – Curvas de calibração das soluções padrão correspondentes a cada metal.

Com base na figura 4.6, verifica-se uma boa linearidade, devido ao valor do coeficiente de correlação ser 0,9999 para o cobre e manganês, e 0,9902 para o zinco.

Tabela 4.16 – Valores de absorvência e respetiva concentração / M, correspondentes a cada amostra utilizada na EAA, para cada metal em estudo, Cobre, Manganês e Zinco.

	Cobre		Manganês		Zinco	
Amostras	Litoral	Interior	Litoral	Interior	Litoral	Interior
Absorvência	0,024	0,018	0,027	0,047	0,398	0,566
Concentração (M)	0,254	0,178	0,262	0,451	1,153	1,684

De acordo com os valores apresentados na tabela 4.16, é possível constatar que as amostras do litoral apresentam maior valor de concentração para o Cobre (0,3 M) e as amostras do interior são mais concentradas em Manganês (0,5 M) e Zinco (1,7 M).

Verificou-se a linearidade calculando o coeficiente de correlação (R^2) e através do teste t de Student. Em relação aos valores de R^2 registados para as retas de calibração, estes revelam um ajuste linear das mesmas, uma vez que estes valores são superiores a 0,99, no entanto, no caso do metal Zinco, foi retirado o último valor (assinalado a * na tabela 4.15) correspondente ao padrão de 2,5 M, para obter um melhor R^2 de acordo com a gama de concentração para o zinco.

O valor de t de Student tabelado, para um nível de confiança de 95 % ($\alpha=0,05$ %) e N-2 graus de liberdade, usado no cálculo dos limites de confiança, foi de 1,895. Atendendo a que $b \pm t \cdot S_b$ é em todos os metais, diferente de zero, significa que o declive é diferente de zero o que implica que as regressões são significativas.

Relativamente aos resultados do selénio, estes não tem valor significativo. Este facto pode ser devido às amostras não conterem selénio, ou por deteriorização das amostras, devido ao tempo entre preparação e respetiva leitura, ou pelo facto de não ser um método viável para determinar selénio nas amostras vegetais em estudo.

Capítulo 5 – Conclusão e Perspetivas Futuras

Capítulo 5 – Conclusão e Perspetivas Futuras

Os métodos de análise estudados neste trabalho permitiram, de uma maneira geral, determinar iodo e metais pesados.

A preparação das amostras desde a sua secagem, calcinação, até à sua dissolução em meio ácido demonstrou ser apropriada, ou seja, houve uma completa secagem da matéria orgânica das amostras minimizando deste modo os interferentes da matriz.

Em relação ao método analítico para a determinação do iodo, segundo a reação de Sandell-Kolthoff, este teve pequenas alterações em relação à literatura já descrita e disponível, pelo que foi validado de acordo com as recomendações da Relacre.

Neste método não foi possível diferenciar os valores de concentração obtidos em relação às amostras, obtendo valores semelhantes em ambas as amostras, provenientes do litoral e interior com valor de 0,053 mg/L.

Devido às alterações ao método de Sandell-Kolthoff, nomeadamente a preparação da solução de arsénio, bem como a utilização do reagente ácido difenilamina - 4 - sulfónico, foi necessário um ajuste na gama de concentrações padrão utilizadas, visto ser um método que permite detetar iodo em quantidades muito pequenas, e a gama de concentrações também teve que ser menor, resultando no ajuste da gama polinomial inicialmente obtida a uma gama linear.

Na verificação da especificidade / seletividade, as percentagens de recuperação situam-se no intervalo entre 95 a 104 %, sendo este um critério de aceitação em laboratório.

Para a gama de trabalho, realizou-se o teste de homogeneidade de variâncias, e o teste PG, obtendo-se uma gama de trabalho bem ajustada, visto que a diferença das variâncias não é significativa.

Em relação à linearidade foi necessário ter em conta a função de calibração linear e função de calibração não linear, pelo que após calcular a diferença de variâncias e o teste PG, verifica-se que a função de calibração é linear.

No estudo da sensibilidade do método, obteve-se um coeficiente de variação de 0,67 %, valor inferior a 10 % pelo que é aceite pelo laboratório. Para os valores de limiares analíticos do método de ensaio, limite de deteção e limite de quantificação, obteve-se respetivamente 0,014 mg/L e 0,042 mg/L. Como o valor de concentração de iodo na amostra é 0,053 mg/L, é possível constatar que segundo este método foi possível detetar e quantificar a presença de iodo nas amostras em estudo.

Quanto à validação da precisão, realizaram-se os estudos dos parâmetros repetibilidade e precisão intermédia, pelo que foi efetuado o cálculo do erro relativo, como os valores obtidos em ambos os parâmetros foram inferiores a 10 %, revela que os valores são concordantes e têm uma boa precisão.

Conclui-se que os valores obtidos, na determinação do iodo estão de acordo com os parâmetros calculados para a validação do método sendo considerados de confiança. E pode-se concluir também que esta alteração ao método da reação de Sandell-Kolthoff permitiu determinar com eficiência, iodo em concentrações relativamente baixas em vegetais bociogénicos.

Na técnica de espectroscopia de absorção atómica, as amostras analisadas pertencentes à espécie *Brassicaceae Napus* (nabo), provenientes da zona litoral (Leiria) e interior (Covilhã) de Portugal, de acordo com os metais em estudo, verificou-se que as amostras do litoral são mais concentradas em cobre, (0,254 M) enquanto as amostras do interior são mais concentradas em manganês (0,451 M) e zinco (1,684 M).

A linearidade deste método foi comprovada pelo coeficiente de correlação e pelo teste t de Student, obtendo-se valores significativos.

Em termos de perspetivas futuras, seria importante alargar o estudo a mais metais que influenciem a tiróide, a utilização de outros vegetais bociogénicos, bem como a aplicação deste método a outro tipo de amostras que influenciam a glândula tiroideia, como por exemplo as águas de consumo.

Determinação de Iodo e de Metais Pesados em Vegetais Bociogénicos

Do ponto de vista de saúde pública, será importante estudar dois grupos de estudo controlo, um com doentes com tendência a desenvolver bócio que consumiriam vegetais bociogénicos e um segundo grupo com doentes com a mesma tendência a desenvolver bócio, mas não iriam consumir vegetais bociogénicos. Seriam feitas análises clínicas a estes doentes, nomeadamente sangue e urina, ao longo de um determinado tempo, e pelo método descrito neste trabalho, determinava-se a quantidade de iodo presente. Através do resultado obtido seria possível confirmar se o consumo de vegetais bociogénicos influencia diretamente o desenvolvimento de bócio, de modo a aumentar a progressão da patologia.

Com este trabalho pretendeu-se determinar a quantidade de iodo em vegetais bociogénicos utilizando um método analítico que permitiu quantificar concentrações baixas em iodo e contribuir para o estudo de metais que influenciam a tiróide.

Bibliografia

1. Francis S. Greenspan, "Basic & Clinical Endocrinology", 2001, pgs 204-210.
2. Vander, "Human Physiology", 2001.
3. Radovan Bílek e Václav Zamrazil, "Thyroglobulin as an Indicator of Iodine Intake", Comprehensive Handbook of Iodine ISBN: 978-0-12-374135-6, 2009.
4. Diego Moreira de Azeredo, "Transtornos relacionados às hormonas da tiróide", Seminário de Pós-Graduação na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004.
5. Rang and Dale's, "Pharmacology", Churchill Livingstone Elsevier, pgs 437-443.
6. Shakaib U. Rehman, Mohammed M. Ahmed e Florence N. Hutchison, "Goiter in the Elderly: The Role of Iodine", Comprehensive Handbook of Iodine ISBN: 978-0-12-374135-6, 2009.
7. Erika Souza Meyer e Ana Luiza Maia, "Pathogenic and Clinical aspects of multinodular goiter", Rev HCPA 2009; 29(3):246-254.
8. Michael Derwahl e Hugo Studer, "Multinodular goitre: 'much more to it than simply iodine deficiency'", Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism, Vol 14, No.4, pgs 577-600, 2000.
9. Knut Krohn e Ralf Paschke, "Somatic mutations in thyroid nodular disease", Molecular genetics and metabolism 75, 202-208, 2002.
10. Knut Krohn, Dagmar Führer, Yvonne Bayer, Markus Eszlinger, Volker Brauer, Susanne Neumann e Ralf Paschke, "Molecular pathogenesis of euthyroid and toxic multinodular goiter", Endocrine Reviews 26(4):504-524, 2005.
11. AACM/AME Task Force on Thyroid Nodules. American Association of Clinical Endocrinologists and Associazione Medici Endocrinologi medical guidelines for clinical practice for the diagnosis and management of thyroid nodules. Endocr Pract, 12(1):63-102, 2006.

12. David S. Cooper , Gerard M. Doherty, Bryan R. Haugen, Richard T. Kloos, Stephanie L. Lee, Susan J. Mandel, Ernest L. Mazzaferri, Bryan McIver, Steven I. Sherman, e R. Michael Tuttle. The American Thyroid Association Guidelines Taskforce. Management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid*, 19 (11):1167-1214, 2009.
13. R. Phitayakorn, M.D., D.M. Super, M.D., e C.R. McHenry, M.D., “An investigation of epidemiology factors associated with large nodular goiter”, *Journal of Surgical research* 133, 16-21, 2006.
14. Graham R. Bignell, Federico Canzian, Maryam Shayeghi, Markus Stark, Yin Y. Shugart, Patrick Biggs, Jonathan Mangion, Rifat Hamoudi, Jacalyn Rosenblatt, Paul Buu, Sophie Sun, Sheldon S. Stoffer, David E. Goldgar, Giovanni Romeo, Richard S. Houlston, Steven A. Narod, Michael R. Stratton, e William D. Foulkes, “Familial nontoxic multinodular thyroid goiter locus maps to chromosome 14q but does not account for familiar nonmedullary thyroid cancer”, *Am. J. Hum. Genet.* 61:1123-1130, 1997.
15. Knudsen N, Laurberg P, Perrild H, Bülow I, Ovesen L e Jørgensen T, “Risk factors for goiter and thyroid nodules”, *Pubmed Thyroid.* 12(10):879-88, 2002.
16. Regina do Carmo Silva, “Importância da avaliação da função tiroideia em pacientes com diabetes mellitus”, *Arq Bras Endocrinol Metab* vol 49 n.º 2 Abril 2005.
17. Gabriela Brenta, “Diabetes and thyroid disorders”, *Bristish Journal of Diabetes & Vascular Disease* 10:172, 2010.
18. Mehmet Soy, Sibel Guldiken, Ender Arikan, Betul Ugur Altun e Armagan Tugrul, “Frequency of rheumatic diseases in patients with autoimmune thyroid disease” *Rheumatol Int* 27:575-577, 2007.
19. Øivind Juris Kanavin, Jan Aaseth e Grethe Støa Birketvedt, “Thyroid hypofunction in Down’s syndrome, is it related to oxidative stress?” *Biological trace element research*, vol. 78, 2000.
20. SM Mousavi, N Tavakoli e F Mardan, “Risk factors for goiter in primary school girls in Qom city of Iran”, *European journal of clinical nutrition*, 60, 426-433, 2006.

21. Mohammad-Hossein Dabbaghmanesh, Abdolsamad Sadegholvaad, Fardad Ejtehad, e Gholamhossein Ranjbar-Omrani, "The role of Iron deficiency in persistent goiter", Arch Iranian med; 11 (2):157-161, 2008.
22. Serkadis M. Getahun e Fung-Lung Chung, "Conversion of Glucosinolates to isothiocyanates in humans after ingestion of cooked watercress", Cancer Epidemiol Biomarkers; 8:447-451, 1999.
23. Jay H Fowke, Jed W Fahey, Katherine K Stephenson e James R Hebert; "Using isothiocyanate excretion as a biological marker of Brassica vegetable consumption in epidemiological studies: evaluating the sources of variability", Public health nutrition: 4(3), 837-846, 2001.
24. J. Liggins, L. J. C. Bluck, S. Runswick, C. Atkinson, W. A. Coward e S. A. Bingham, "Daidzain and genisteína contents of vegetables", British Journal of nutrition, 84, 717-725, 2000.
25. Conaway, C. C., Getahun, S. M., Liebes, L. L., Pusateri, D. J., Topham, D. K., Botero-Omary, M., Chung, F. L. American Health Foundation, Valhalla, NY e Nutrilite Division of Amway Corporation, Buena Park, CA., "Disposition of glucosinolates and sulforaphane in humans after ingestion of steamed and fresh broccoli", Nutr cancer; 38 (2):168-178, 2000.
26. Belitz e Grosch, "Food chemistry book" , Springer, pgs 395-745, 1999.
27. Lone B. Rasmussen, Peter Laurberg and Lars Ovesen," Relationship between Iodine Intake and Thyroid Size", Comprehensive Handbook of Iodine ISBN: 978-0-12-374135-6, 2009.
28. Ruchika Mehra and Kalyan Srinivasan, "Iodine Fortification: Some Industrial Initiatives and Concerns", Comprehensive Handbook of Iodine ISBN: 978-0-12-374135-6, 2009.
29. Belma Giray, Josiane Arnaud, Iskender Sayek, Alain Favier e Filiz Hincal, "Trace elements status in multinodular goiter", Journal of trace elements in medicine and biology 24, 106-110, 2010.
30. http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0607/iodo/IODO_ficheiros_

31. Vincenzo Triggiani, Emilio Tafaro, Vito Angelo Giagulli, Carlo Sabbà, Francesco Resta, Brunella Licchelli e Edoardo Guastamacchia, "Role of iodine, selenium and other micronutrients in thyroid function and disorders", *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders – Drug Targets*, 9,277-294, 2009.
32. "Iodine Monograph", *Alternative Medicine Review*, volume 15, number 3, 2010.
33. Mário Vaisman, Doris Rosenthal e Denise P. Carvalho, "Enzimas envolvidas na organificação tiroideia do iodo", *Arq Bras Endocrinol Metab* vol 48 nº1, 2004.
34. Maria Andersson, Bahi Takkouche, Ines Egli, Henrietta E. Allen, e Bruno de Benoist, "Current global iodine status and progress over the last decade towards the elimination of iodine deficiency", *Bulletin of the world health organization*, 83:518-525, 2005.
35. Stig Andersen, Haixia Guan, Weiping Teng e Peter Laurberg, "Speciation of iodine in high iodine groundwater in China associated with goiter and hypothyroidism", *Biol trace elem res*, 128:95-103, 2009.
36. Eman M. Alissa & Khalid AlShali e Gordon A Ferns, "Iodine deficiency among hypothyroid patients living in Jeddah", *Biol trace elem res*, 130:193-303, 2009.
37. Rogerio Sarmiento, "Revisões sistemáticas em terapia intensiva-suplementação de selénio", *Medicina Perioperatória*, cap 101.
38. Karla Silva Ferreira, José Carlos Gomes, Carlos Roberto Bellato e Cláudio Pereira Jordão, "Concentrações de selénio em alimentos consumidos no Brasil", *ver panam Salud Publica/Pan Am J Public Health* 11 (3), 2002.
39. Christine D. Thomson, Sarah K. McLachlan, Andrea M. Grant, Elaine Paterson e Anna J. Lillico, "The effect of selenium on thyroid status in a population with marginal selenium and iodine status", *Bristish Journal of Nutrition*, 94, 962-968, 2005.
40. Iham Amir Al-Juboori, Rafi Al-Rawi, Hussein Kadhem A-Hakeim, "Estimation of Serum Copper, Manganese, Selenium, and Zinc in Hypothyroidism Patients", *IUFS Journal of Biology IUFS J Biol* 2009, 68(2): 121-12.

41. <http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0405/manganes/manganes.htm>.
42. O.P. Soldin e M. Aschner, "Effects of manganese on thyroid hormone homeostasis: potencial links", *NeuroToxicology* 28, 951-956, 2007.
43. Denise Mafra e Silvia Cozzolino, " Importância do zinco na nutrição humana", *Rev. Nutr.*, Campinas, 17 (1):79-87, 2004.
44. Dietary Reference Intakes: Recommended Intakes for Individuals Elements, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academies, 2004.
45. Raynério Costa Marques e Dilina do Nascimento Marreiro, "Aspetos metabólicos e funcionais do zinco no síndrome de Down", *Rev. Nutr.*, Campinas, 19 (4):501-510, 2006.
46. Gaethke, L. M. et al; Copper toxicity, oxidative stress and antioxidant nutrients. *Toxicol.* 189: 147-163, 2003.
47. Curtis D. Klaassen e John B. Watkins, "Casarett & Doull's Toxicology, The Basic science of poisons", McGraw-Hill, pgs 840-848, 1999.
48. Édira de Andrade, Anderson Teodoro e Iracema Takase, "Determinação dos teores de cobre em diferentes extratos de hortaliças do tipo a e b", *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 24 (2): 277-281, 2004.
49. Maria Mozarina Beserra Almeida, Maria de Fátima Gomes Lopes, Célia Maria Diógenes Nogueira, Carlos Emanuel de Carvalho Magalhães e Noélia Maria Tavares de Morais, "Determinação de nutrientes minerais em plantas medicinais", *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 22 (1): 94-97, 2002.
50. Édira de Andrade, Simone Alves e Iracema Takase, "Extração sequencial de cobre, ferro e zinco em ervas medicinais", *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 25(4): 844-848, 2005.
51. Andrew D. Eaton, Lenore S. Clesceri e Arnold E. Greenberg, "Standart methods for the examination of water and wastewater", American public health association, 19ª edição, 1995.

52. Jan Kucera, "Assay of iodine in foodstuffs: methods and applications", Nuclear Physics Institute, Academy of Sciences of the Czech Republic, 2009.
53. Viktor Stole, "The determination of nano-amounts of iodine in waters, plants, foods, special diets, tissues and soils", SAV Endocrinological Institute, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Czechoslovakia, 1963.
54. O. M. Trokhimenko e V. N. Zaitsev, "Kinetic Determination of Iodide by the Sandell Kolthoff Reaction Using Diphenylamine-4-Sulfonic Acid", Journal of Analytical Chemistry, Vol. 59, No. 5, 2004, pp. 491–494.
55. Pedro A. Rodriguez e Harry L. Pardue, "Analytical Applications of the Iodide and Osmium Catalyzed Reaction between Cerium (IV) and Arsenic (III)", Anal. Chem., 1969, 41 (11), pp 1376–1380.
56. C. Phillip Shelor, Purnendu K. Dasgupta, "Review of analytical methods for the quantification of iodine in complex matrices", Analytica Chimica Acta 702 (2011) 16 – 36.
57. "Orientação sobre validação de métodos analíticos", Coordenação geral de acreditação; DOQ-CGCRE-008 Revisão 03. – FEV/2010.
58. Andréia Silva e Míriam Alves, "Como iniciar a validação de métodos analíticos", Enqualab 2006.
59. Natilene Brito, Ozelito Junior, Luciana Polese, Maria Lúcia Ribeiro, "Validação de métodos analíticos: Estratégia e discussão", Pesticidas: R. Ecotoxicol. E Meio Ambiente, Curitiba, v.13, p. 129-146, jan./dez. 2003.
60. Alexandra Mendes, "Implementação e Validação de Métodos Analíticos", Laboratório Regional de Controlo da Qualidade da Água, Funchal.
61. Guia relacre 13 (2000), "Validação de métodos internos de ensaio em Análise Química", Relacre, Lisboa.
62. Miller J.C. e Miller J.N., "Statistics for Analytical Chemistry", Ellis & Horwood, 3ª edição, Chichester, 1993.

63. Maria de Lurdes Gonçalves, “Métodos instrumentais para análise de soluções, análise quantitativa”, Fundação Calouste Gulbenkian, 1996.
64. L.H.J. Lajunem, “Spectrochemical Analysis by atomic absorption and emission”, Royal Society of Chemistry, 1992.

Anexos

Anexo 1 – Dados de reagentes utilizados no trabalho experimental

Tabela A1 – Registo de dados dos reagentes utilizados no trabalho experimental.

Reagentes	F. Química	MM (g/mol)	Riscos	Segurança	Marca
Acetato de Amónio	CH ₃ COONH ₄	77,08			Merck
Ácido Acético	CH ₃ COOH	60	10,35	2,23,26	Pronalab
Ácido Clorídrico	HCl	36,46	34,37	26,45	Panreac
Ácido difenilamina-4-sulfónico	C ₂₄ H ₂₀ N ₂ O ₆ S ₂	496,31	22,34	26,36,37,39,45	Aldrich
Ácido Nítrico	HNO ₃	63,01	35	2,23,26,27	Pronalab
Carbonato de Sódio	Na ₂ CO ₃	105,99	36	22-26	Pronalab
Cloreto de Cálcio	CaCl ₂	110,99	36	22-24	BDH
Cobre	Cu		36,38	26	Merck
Hidróxido de Sódio	NaOH	39,97	35	26-37,39-45	Pronalab
Iodeto de Potássio	KI	166,01			Panreac
Manganês	Mn		36/38		Merck
Sulfato de Amónio Cérico	Na ₂ SO ₄ Ce	632,54		24-25	AcrósOrganics
Sulfato de Zinco	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	287,55			RiedeldeHaen
Trióxido de Arsénio	As ₂ O ₃	197,84	56,84	3,12,21,31,53, 63,72,91,108	Merck
Zinco	Zn		36,38		Merck

Lista de Frases de Risco e Segurança dos reagentes utilizados no trabalho experimental:

- R10 Inflamável
- R22 Nocivo por ingestão
- R34 Provoca queimaduras
- R35 Provoca queimaduras graves
- R36 Irritante para os olhos
- R37 Irritante para as vias respiratórias
- R38 Irritante para a pele
- R56 Tóxico para os organismos do solo
- S2 Guardar fora do alcance das crianças
- S3 Guardar em lugar fresco
- S12 Não fechar o recipiente hermeticamente
- S21 Não fumar durante a utilização
- S22 Não respirar as poeiras
- S23 Não respirar os gases/vapores/fumos/aerossóis
- S24 Evitar o contacto com a pele
- S25 Evitar o contacto com os olhos
- S26 Em caso de contacto com os olhos, lavar imediata e abundantemente com água e consultar um médico
- S27 Retirar imediatamente toda a roupa contaminada
- S28 Após o contacto com a pele, lavar imediata e abundantemente com produto adequado
- S29 Não deitar os resíduos nos esgotos
- S30 Nunca adicionar água a este produto
- S31 Conservar afastado de substâncias explosivas
- S33 Evitar acumulação de cargas electrostáticas
- S34 Evitar o choque e a fricção
- S35 Não se desfazer deste produto e do seu recipiente sem tomar as devidas precauções de segurança devida.
- S36 Usar vestuário de proteção adequado
- S37 Usar luvas apropriadas
- S39 Usar equipamento de proteção de olhos e cara
- S40 Para limpar o pavimento e os objetos contaminados com este produto utilizar um produto adequado
- S41 Em caso de incêndio e/ou explosão não respirar os fumos
- S42 Durante as pulverizações usar equipamento apropriado
- S43 Em caso de incêndio, usar meios de extinção adequados
- S44 Em caso de indisposição, consultar um médico
- S45 Em caso de acidente ou indisposição consultar imediatamente um médico
- S53 Evitar a exposição – obter instruções específicas antes de utilização

Anexo 2 – Cálculos das soluções utilizadas no trabalho experimental

➤ Cálculo de soluções utilizadas na Extração Sequencial

$$V = 250 \text{ mL}$$

- CaCl_2 (0,1M)

$$M(\text{CaCl}_2) = 110,99 \text{ g/mol}$$

$$C = \frac{n}{V} \Leftrightarrow n = 1,0 \times (250 \times 10^{-3}) \Leftrightarrow n = 0,25 \text{ mol}$$

$$n = \frac{m}{M} \Leftrightarrow m = 0,25 \times 110,99 \Leftrightarrow m = 27,7 \text{ g}$$

- CH_3COOH 0,1 M

$$M(\text{CH}_3\text{COOH}) = 60,05 \text{ g/mol}$$

$$P = 1,050 \text{ kg/L}$$

$$C = \frac{n}{V} \Leftrightarrow n = 0,1 \times (250 \times 10^{-3}) \Leftrightarrow n = 0,025 \text{ mol}$$

$$n = \frac{m}{M} \Leftrightarrow m = 0,025 \times 60,05 \Leftrightarrow m = 0,0015 \text{ kg}$$

$$p = \frac{m}{V} \Leftrightarrow V = \frac{0,0015}{1,050} \Leftrightarrow V = 1,43 \text{ mL}$$

- CH_3COOH 0,5 M

$$C = \frac{n}{V} \Leftrightarrow n = 0,5 \times (250 \times 10^{-3}) \Leftrightarrow n = 0,125 \text{ mol}$$

$$n = \frac{m}{M} \Leftrightarrow m = 0,125 \times 60,05 \Leftrightarrow m = 0,0075 \text{ kg}$$

$$p = \frac{m}{V} \Leftrightarrow V = \frac{0,0075}{1,050} \Leftrightarrow V = 7,15 \text{ mL}$$

Determinação de Iodo e de Metais Pesados em Vegetais Bociogénicos

- NaOH 0,1M

$$p = 1 \text{ kg/L}$$

$$C = \frac{n}{V} \Leftrightarrow n = 0,1 \times (250 \times 10^{-3}) \Leftrightarrow n = 0,025 \text{ mol}$$

$$n = \frac{m}{M} \Leftrightarrow m = 0,025 \times 39,97 \Leftrightarrow m = 0,99925 \text{ kg}$$

- HCl 0,5M

$$p = 1,19 \text{ kg/L}$$

$$M(\text{HCl}) = 36,45 \text{ g/mol}$$

$$C = \frac{n}{V} \Leftrightarrow n = 0,5 \times (250 \times 10^{-3}) \Leftrightarrow n = 0,125 \text{ mol}$$

$$n = \frac{m}{M} \Leftrightarrow m = 0,125 \times 36,45 \Leftrightarrow m = 0,004556 \text{ kg}$$

$$p = \frac{m}{V} \Leftrightarrow V = \frac{0,004556}{1,19} \Leftrightarrow V = 3,829 \text{ mL}$$

- $\text{CH}_3\text{COONH}_4$

$$M(\text{CH}_3\text{COONH}_4) = 77,08 \text{ g/mol}$$

$$p = 1 \text{ kg/L}$$

$$C = \frac{n}{V} \Leftrightarrow n = 0,5 \times (250 \times 10^{-3}) \Leftrightarrow n = 0,125 \text{ mol}$$

$$n = \frac{m}{M} \Leftrightarrow m = 0,125 \times 77,08 \Leftrightarrow m = 9,635 \text{ g}$$

$$9,635 \text{ g} \text{ ----- } 100 \%$$

$$X \text{ ----- } 5 \% \quad x = 0,482 \text{ g}$$

➤ **Cálculo de soluções padrão a utilizar na espectroscopia de absorção atómica**

- Solução mãe

$$C_i = 1000 \text{ mg/L} = 1000 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$C_f = 10 \text{ mg/L} = 10 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$V_f = 100 \text{ mL}$$

$$1000 \times V = 10 \times 10 \Leftrightarrow V = 1 \text{ mL}$$

Retira-se 1 mL da solução do metal e perfaz-se o volume de 100 mL com água. Desta solução retiram-se os seguintes volumes; 0,5; 1; 2; 5; 10; 15; 20 e 25 mL.

A cada solução adiciona-se 1 mL de ácido nítrico e perfaz-se o volume de 100 mL com água. Cada solução fica respetivamente com a concentração de 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2 e 2,5 M.

Este procedimento efetua-se de igual modo para todos os metais em estudo; cobre, manganês e zinco.

➤ **Cálculo de soluções para posterior determinação de iodo**

- Sulfato de Zinco (ZnSO_4), 10%

$$M(\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}) = 287,55 \text{ g/mol}$$

$$p = 1 \text{ kg/L}$$

$$C = 0,1 \text{ M}$$

$$V = 500 \text{ mL}$$

$$C = \frac{n}{V} \Leftrightarrow n = 0,1 \times (500 \times 10^{-3}) \Leftrightarrow n = 0,05 \text{ mol}$$

$$n = \frac{m}{M} \Leftrightarrow m = 0,05 \times 287,55 \Leftrightarrow m = 14,378 \text{ g}$$

$$14,378 \text{ g} \text{ ----- } 100 \%$$

$$X \text{ ----- } 10 \% \qquad x = 1,44 \text{ g}$$

Determinação de Iodo e de Metais Pesados em Vegetais Bociogénicos

- Carbonato de Sódio (Na_2CO_3), 2N

$$M = 105,99 \text{ g/mol}$$

$$C = 2N = 1M$$

$$V = 500 \text{ mL}$$

$$C = \frac{n}{V} \Leftrightarrow n = 1 \times (500 \times 10^{-3}) \Leftrightarrow n = 0,5 \text{ mol}$$

$$n = \frac{m}{M} \Leftrightarrow m = 0,5 \times 105,99 \Leftrightarrow m = 52,995 \text{ g}$$

- Iodeto de Potássio (KI), 0,01M

$$M = 166,01 \text{ g/mol}$$

$$C = 0,01 \text{ M}$$

$$V = 1 \text{ L}$$

$$C = \frac{n}{V} \Leftrightarrow n = 0,01 \times 1 \Leftrightarrow n = 0,01 \text{ mol}$$

$$n = \frac{m}{M} \Leftrightarrow m = 0,01 \times 166,01 \Leftrightarrow m = 1,66 \text{ g}$$

- Trióxido de Arsénio (As_2O_3), 0,25M

$$M = 198 \text{ g/mol}$$

$$C = 0,25 \text{ M}$$

$$V = 500 \text{ mL}$$

$$C = \frac{n}{V} \Leftrightarrow n = 0,25 \times 0,5 \Leftrightarrow n = 0,125 \text{ mol}$$

$$n = \frac{m}{M} \Leftrightarrow m = 0,125 \times 198 \Leftrightarrow m = 24,75 \text{ g}$$

Dissolver 24,75 g de As_2O_3 em 500 mL de água quente, adicionar 100mL da solução KOH 7% e diluir para 1L.

Determinação de Iodo e de Metais Pesados em Vegetais Bociogénicos

- Sulfato de Amónio Cérico ($\text{Na}_2\text{SO}_4\text{Ce}$), 0,005 M

$$M = 632,54 \text{ g/mol}$$

$$C = 0,005 \text{ M}$$

$$V = 1 \text{ L}$$

$$C = \frac{n}{V} \Leftrightarrow n = 0,005 \times 1 \Leftrightarrow n = 0,005 \text{ mol}$$

$$n = \frac{m}{M} \Leftrightarrow m = 0,005 \times 632,54 \Leftrightarrow m = 3,1627 \text{ g}$$

- Ácido Difenilamina - 4 - sulfónico ($\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2$)

$$M = 472 \text{ g/mol}$$

$$C = 0,02 \text{ M}$$

$$V = 80 \text{ mL}$$

$$C = \frac{n}{V} \Leftrightarrow n = 0,02 \times 0,08 \Leftrightarrow n = 0,0016 \text{ mol}$$

$$n = \frac{m}{M} \Leftrightarrow m = 0,0016 \times 472 \Leftrightarrow m = 0,75 \text{ g} \Leftrightarrow m = 755,2 \text{ mg}$$