

Sandra de Fátima Sendas Borges

Pesquisa de uma correlação entre elementos do solo e matrizes biológicas de uma população

Mestrado em Química Forense

Departamento de Química

FCTUC

Setembro 2013



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Sandra de Fátima Sendas Borges

Pesquisa de uma correlação entre elementos do solo e matrizes biológicas de uma população

**Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química
Forense**

Doutor António Manuel d'A. Rocha Gonsalves

Setembro 2013

Universidade de Coimbra

Agradecimentos

A todos os que me apoiaram neste ano de muito trabalho desejo expressar os meus sinceros agradecimentos.

Ao meu orientador, o Doutor Rocha Gonsalves, pela disponibilidade manifestada para orientar este trabalho, pela orientação científica assim como por todas as sugestões e críticas e pela revisão crítica do texto.

À Doutora Mónica Marques, pela ajuda na definição do objeto de estudo.

Em especial, à Doutora Ângela Almeida por todos os conhecimentos transmitidos, pela ajuda, e acima de tudo, exigência.

À Patrícia, por toda a paciência e apoio moral.

A todos os inquiridos de Macedo de Cavaleiros, Grijó, Sobreda e Morais, que foram prestativos e pacientes na colaboração deste projeto, na realização dos inquéritos e na cedência das amostras.

Ao André, por estar sempre pronto a ajudar.

Ao meu melhor amigo e namorado, pela paciência e todas as palavras de amor e de encorajamento. Obrigada por fazeres parte de minha vida.

Um obrigada muito especial aos meus pais, pelo incansável apoio moral e pela motivação, porque sem eles nada seria possível. Este trabalho é dedicado a vocês.

A Coimbra, uma cidade encantadora que me proporcionou os melhores anos da minha vida.

O meu Obrigada a todos!

Índice

Abreviaturas.....	iv
Resumo	v
Abstract.....	vi
Capítulo 1 - Introdução	1
1.1. Introdução geral	2
1.2. Matrizes	2
1.2.1. Solo.....	3
1.2.2. Vinho	4
1.2.3. Urina.....	5
1.2.4. Cabelo.....	6
1.2.5. Unhas	8
1.3. Metais.....	10
1.3.1. Cobre	10
1.3.2. Ferro	12
1.3.3. Níquel	13
1.3.4. Zinco.....	14
1.4. Análise quantitativa de metais	15
1.4.1. ICP-AES	15
1.4.2. FAAS	17
1.4.3. GFAAS	18
1.5. Descrição da região de recolha das amostras.....	20
Capítulo 2 - Apresentação de Resultados e Discussão.....	22
2.1. Caracterização da amostra	23

2.2.	Solo	24
2.2.1.	pH	24
2.2.2.	Concentrações dos elementos no solo	26
2.3.	Vinho	30
2.4.	Urina	34
2.5.	Cabelo	36
2.6.	Unhas	38
2.7.	Relações entre as variáveis estudadas.....	42
2.8.	Principais problemas e limitações no estudo	54
Capítulo 3 - Conclusão		56
Capítulo 4 - Procedimento Experimental		59
4.1.	Materiais	60
4.2.	Reagentes	60
4.3.	Equipamentos.....	61
4.4.	Amostragem.....	62
4.5.	Determinação do pH das amostras de solo	65
4.6.	Tratamento das amostras	65
4.7.	Preparação de soluções	70
4.8.	Análise	76
4.9.	Quantificação dos elementos	83
Capítulo 5 - Bibliografia.....		85
Capítulo 6 - Anexos.....		95

Abreviaturas

AAS - Espectrometria de Absorção Atômica;

EPA - Agência de Proteção Ambiental;

FAAS - Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização em Chama;

GFAAS - Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização em Câmara de Grafite;

HClO₄ - Ácido Perclórico;

HNO₃ - Ácido Nítrico;

H₂O₂ - Peróxido de Hidrogénio;

IAEA - Agência Internacional de Energia Atômica;

ICP-AES - Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado;

LD - Limite de Detecção;

LQ - Limite de Quantificação;

OIV - Organização Internacional do Vinho e da Vinha;

Rpm - Rotações por minuto;

RSD - Desvio Padrão Relativo;

SH - Grupo sulfidrilo.

Resumo

Neste trabalho foram determinadas as concentrações dos elementos Cu, Fe, Zn e Ni, em diversas matrizes (solo, vinho, urina, cabelo e unhas), utilizando três técnicas espectrométricas, a Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado, a Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização em Câmara de Grafite e também a Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização em Chama.

O objetivo principal deste trabalho é verificar se existe uma relação entre as concentrações de alguns elementos encontrados no solo da região de Macedo de Cavaleiros e os indivíduos que vivem nessa zona. Para estabelecer essa relação foi também analisado o vinho, admitindo que os metais existentes no solo são transferidos para o ser humano através do consumo de vinho, e assumindo também que o Cu, Fe, Zn e Ni podem acumular-se em certos tecidos biológicos, de modo a que esses metais possam ser constituídos marcadores da região considerada.

Sabendo que à partida poderá haver uma relação entre a composição do vinho e a composição do solo, questiona-se cada vez mais se haverá também relação destes com a ingestão significativa de metais por parte do Homem, podendo causar problemas de saúde. Assim, a necessidade de monitorização biológica obriga à análise de matrizes biológicas como urina, cabelo e unhas para a determinação das concentrações de metais com fins de diagnóstico nutricional, clínico, toxicológico ou forense.

Abstract

In this study were determined the concentrations of Cu, Fe, Zn and Ni in different matrices (soil, wine, hair, nails and urine), using three spectrometric techniques, Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry, Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry and Flame Atomic Absorption Spectrometry.

The aim of this study is to check whether there is a relationship between the concentrations of some elements found in the soil from Macedo de Cavaleiros and the individuals who live in this region. To establish this relationship, wine was also analyzed, assuming that the metals in the soil are transferred to humans through the consumption of wine, and also assuming that Cu, Fe, Zn and Ni can accumulate in certain biological tissues, so that these metals can be constituted markers of the considered region.

Knowing from the start it may be a relationship between wine composition and soil composition, the question is whether there will be also a relationship of these with the significant intake of metals by humans and can cause serious health problems. Thus, the need for biological monitoring requires the analysis of biological matrices such as urine, hair and nails for determination of metals concentration with the purposes of nutritional diagnostic, clinical, toxicological and forensic.

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

Neste capítulo são abordados aspetos gerais importantes para esta dissertação. É o caso das diversas matrizes e metais que foram analisados, uma breve descrição das técnicas analíticas utilizadas e, por último, a descrição da região onde foram recolhidas as amostras analisadas neste projeto científico.

1.1. Introdução geral

A segurança alimentar e o controlo de qualidade dos alimentos e bebidas são uma das áreas abrangidas pela Química Forense sendo uma forma de avaliar a qualidade, detetar adulterações e verificar a autenticidade dos produtos.

As sociedades modernas consomem grandes quantidades de vinho, por vezes aumentando a ingestão diária de metais, podendo levar a casos de intoxicação (Galani-Nikolakaki, S. et al., 2002). Controlos meticulosos são necessários para avaliar fatores, como a origem geográfica e práticas enológicas, como uma forma de avaliar a qualidade do vinho (Saurina, J., 2010).

A qualidade do vinho e as suas características organoléticas estão diretamente relacionadas com a sua composição, e por sua vez a composição mineral do vinho reflete a composição mineral do solo de origem e as suas características. No entanto, a composição mineral do vinho também depende de outros fatores, como a variedade da uva, as condições climáticas, a composição de pesticidas e fertilizantes utilizados, os métodos e equipamentos de vinificação, etc. (Fiket, Ž. et al., 2011).

Os metais são um dos poluentes mais graves no ambiente e, por isso, é cada vez maior a preocupação com os efeitos adversos na saúde humana (Melaku, S. et al., 2005). Assim, há uma crescente necessidade de analisar metais em matrizes ambientais, como o solo, nos alimentos e bebidas, como é o caso do vinho, e também em matrizes biológicas, de forma a identificar possíveis fontes de contaminação por metais no Homem.

1.2. Matrizes

Este ponto aborda os diferentes tipos de amostras que foram analisadas neste projeto científico, como é o caso do solo, do vinho e das matrizes biológicas como a urina, cabelo e unhas.

1.2.1. Solo

O solo é definido como a camada superficial da crosta terrestre. A formação e a evolução do solo são um fenómeno de génese física, química e biológica e depende de diversos fatores, como o clima, a permeabilidade da rocha-mãe, a vegetação e tipo de matéria orgânica produzida, o relevo e a intervenção humana (Afonso, J., 2009).

A viticultura, ou seja, a prática da produção de uvas, é considerada um dos usos do solo que faz com que a deterioração deste seja mais intensa (Fernández-Calviño, D. et al., 2009). O solo tem grande importância nesta prática, uma vez que, sustenta não só a raiz da videira mas também fornece os minerais e nutrientes necessários, e assim a qualidade do vinho depende da composição física, química e biológica do solo das vinhas.

O solo é constituído essencialmente por matéria mineral proveniente da desagregação das rochas, por matéria orgânica, água e ar (Reichert, J. M., 2007). Os elementos encontrados com maior frequência no solo são: Cu, Fe, Mn, Mo, Zn, Co, Ni, Al, Cd e Cr. Um nutriente essencial é aquele sem o qual a planta não cresce normalmente. C, O, H, N, P, K, Ca, Mg e S são designados por macronutrientes, por serem necessários em quantidades mais elevadas, enquanto o Fe, Mn, Zn, Cu, Ni, B, Mo e Cl são designados micronutrientes, sendo todos eles elementos essenciais para o crescimento das plantas. Os micronutrientes também são chamados de elementos menores ou elementos vestigiais. A videira tem necessidades nutritivas baixas, necessitando principalmente de N, K e P em quantidades moderadas e quantidades residuais de Mg, Fe, Mn, Zn, Cu e B (Afonso, J., 2009).

Os solos distinguem-se pelas suas características físicas (cor, textura, estrutura, porosidade, permeabilidade), químicas (poder de absorção, pH, composição química) e biológicas (Reichert, J. M., 2007). As características físicas e químicas dos solos condicionam o crescimento vegetal, ao fazer variar a capacidade de retenção da água, a solubilidade dos elementos minerais, a lixiviação dos nutrientes e o pH.

Em Portugal, os solos são em geral ácidos. Os valores de pH frequentes nos solos variam entre 4 e 8,5, sendo considerados neutros, na prática, aqueles cujo pH varia entre 6,6 e 7,3 (Freitas, F., 1984). Existem fatores que condicionam a intensa acidificação do solo, como a elevada precipitação, a natureza do material originário (rochas ígneas ácidas) e os

elevados teores de matéria orgânica (Freitas, F., 1984). Diferenças entre os solos são visíveis de norte a sul do país e justificam-se pelas grandes diferenças na topografia e geologia que, por sua vez, influenciam as práticas agrícolas, nomeadamente o cultivo da vinha.

Altos níveis de metais no solo, e por meio de processos de transferência, na água e nas plantas, podem ter um efeito negativo sobre o ambiente e na saúde humana (Sastre, J., et al., 2002). Ou seja, a intensa atividade humana está a gerar um forte impacto que pode ter repercussões negativas sobre os solos, bem como efeitos negativos sobre a qualidade dos produtos agrícolas, nomeadamente o vinho.

1.2.2. Vinho

O vinho é uma das bebidas alcoólicas mais consumidas em todo o mundo. Este resulta da fermentação alcoólica do sumo das uvas, em que os açúcares por ação de leveduras são transformados em álcool com libertação de CO₂ (Fiket, Ž. et al., 2011; Pedro, J., 1991).

Portugal é um dos principais produtores de vinho a nível mundial (Marques, A. S., et al.). A vinha encontra-se implantada em quase todo o território nacional, sendo que a videira mais cultivada em Portugal é da espécie *Vitis vinifera* (Marques, A. S., et al.). As castas são variedades da videira e distinguem-se consoante a coloração das uvas, em brancas, rosadas ou tintas, e de um modo geral, os vinhos delas derivados designam-se por brancos, rosados ou tintos (Pedro, J., 1991).

Do ponto de vista químico, o vinho, além de água, contém uma grande variedade de componentes orgânicos (álcoois, açúcares, proteínas, aminoácidos e polissacarídeos) e inorgânicos (minerais e outros compostos vestigiais) (Grindlay, G. et al., 2009). Representando cerca de 1,5 a 3 g/L no seu total, os elementos minerais presentes no vinho, são importantes para a fermentação alcoólica deste e para as suas propriedades organoléticas (cor, sabor e aroma) (Pohl, P., 2007).

A presença de elementos no vinho está geralmente relacionada com a composição mineral do solo bem como com os processos de absorção das videiras, embora possa ser alterada pelas práticas vitivinícolas e enológicas (Mira de Orduña, R., 2010; Villiers, A. et

al., 2012). Podem também ocorrer contaminações de origem diversa: atmosférica, através de aditivos e fungicidas, equipamentos utilizados na vinificação, estabilização e conservação (Catarino, S. et al., 2008).

Entre a multiplicidade de componentes do vinho, o conteúdo mineral apresenta grande interesse devido à sua implicação em três áreas principais: características organoléticas, risco toxicológico e origem geográfica (Álvarez, M. et al., 2012).

Um dos muitos interesses da análise de vinhos é utilizar o conteúdo em metais para caracterizar os vinhos pela sua origem geográfica tendo em conta a relação entre o conteúdo metálico das amostras de vinho e a composição do solo (Grindlay, G. et al., 2009). Isto é baseado no princípio de que os elementos presentes no vinho são derivados do solo (único para um determinado local geográfico) e que as concentrações da maioria dos elementos não são significativamente alteradas durante a produção, transporte e armazenamento do vinho (Grindlay, G. et al., 2009). Contudo, outros fatores como os anteriormente falados podem também ter efeito na composição do vinho (Moreno, I. M. et al., 2007).

O consumo diário de vinho em quantidades moderadas contribui significativamente para as necessidades do organismo humano em elementos essenciais como Ca, Co, Cr, Cu, Fe, K, Se, Mg, Mn, Mo, Ni e Zn (Álvarez, M. et al., 2012). No entanto, o consumo de grandes quantidades de vinho pode levar à absorção diária elevada destes elementos (Grindlay, G. et al., 2009). Deve notar-se que a biodisponibilidade e a toxicidade dos metais estão relacionadas com as formas físico-químicas destes (Catarino, S. et al., 2008; Galani-Nikolakaki, S. et al., 2002).

1.2.3. Urina

O organismo encarrega-se de eliminar os produtos residuais do organismo, expelindo-os sob a forma de suor (através da pele), da urina e das fezes. Também podem ser incorporados no cabelo, em ossos ou outros tecidos quando a exposição for excessiva ou contínua.

A urina normalmente é um líquido transparente, de cor amarelada, é produzida pelos rins, excretada através das vias urinárias e desempenha um papel importante na regulação do balanço de líquidos e no equilíbrio entre ácidos e bases.

A urina humana é constituída principalmente por água (cerca de 95%), com solutos orgânicos dissolvidos incluindo ureia, ácido úrico, pequenas quantidades de enzimas, hidratos de carbono, hormonas e iões inorgânicos, como Na, K, Cl, Mg, Ca, SO_4^{2-} e PO_4^{3-} , que formam os restantes 5% (Koolman, J. and Roehm, K. H., 2005).

Os elementos essenciais (Cu, Fe, Zn, Ba, B, Ca, Cr, Co, Li, Mn, Mo, P, Se, etc.) estão envolvidos em praticamente todos os processos metabólicos e bioquímicos, e as concentrações destes na urina são geralmente reflexivos da ingestão recente. Consequentemente, análises de urina para os elementos essenciais podem ser usadas para avaliar o estado nutricional.

A região de residência e muitos outros fatores, como a alimentação, consumo de bebidas (por exemplo, o vinho), estado de saúde, medicamentos, etc. podem afetar as concentrações de elementos, sejam tóxicos ou vestigiais, no corpo humano (Cornelis, R. et al., 1996). A função renal desordenada pode conduzir a uma mudança no volume da urina excretada por dia, juntamente com alterações nas suas propriedades físicas e químicas.

A urina é facilmente recolhida e fornece um indicador útil da exposição a metais (Horng, C.-J., et al., 2002). As amostras de urina são excelentes para mostrar as exposições atuais a metais, porque refletem o nível destes na corrente sanguínea nas horas imediatamente antes do esvaziamento da bexiga (Crinnion, W. J., 2009).

As concentrações de metais na urina têm sido comumente utilizadas para fins de diagnóstico clínico e para avaliação da retenção de metais no organismo (Bermejo-Barrera, P., et al., 2002). Em toxicologia clínica e forense, a quantificação de metais na urina é o mais importante para a monitorização da exposição a metais pesados, como Pb e Hg (Gouille, J. P. et al., 2005). Alguns outros metais também são de interesse clínico ou forense, como Al, Mn, Cr, Co, Ni, Cu, Se, entre outros (Gouille, J. P. et al., 2005).

1.2.4. Cabelo

O cabelo, além de ser um adorno, tem a função de proteger a cabeça dos raios solares e também proporciona um certo isolamento térmico, através da retenção de água e diminuição da perda de calor (Pozebon, D. et al., 1999). Do que se pode ler na literatura, a taxa de crescimento médio do cabelo humano é de cerca de 1 cm por mês.

Na constituição do fio de cabelo encontramos proteínas (80%), como o colagénio e a elastina. Outros componentes do cabelo são a água (15%), lípidos, pigmentos e elementos como Zn, Fe, Cu, etc. (Pozebon, D. et al., 1999). Os elementos presentes no cabelo são divididos em macrominerais (Ca, O, Mg, Na, K e Cl) e microminerais ou elementos vestigiais (Chojnacka, K. et al., 2006). O último grupo é dividido em elementos vestigiais essenciais e elementos vestigiais tóxicos, em que o grupo dos elementos vestigiais essenciais é distinguido entre maiores (Fe, Zn, Cu) e menores (Ni, Mn, Se, Cr, Co) (Chojnacka, K. et al., 2006; Pozebon, D. et al., 1999).

O cabelo é originado a partir do folículo piloso localizado 3 a 5 mm abaixo da superfície da pele (LeBeau, M. A. et al., 2011; Pragst, F. and Balikova, M. A., 2006). É basicamente constituído por três camadas: cutícula (camada externa), córtex (parte intermédia, formada por um conjunto de células denominado de matriz, local onde fica situada a queratina e outras proteínas) e medula (camada mais interna) (Pozebon, D. et al., 1999; Pragst, F. and Balikova, M. A., 2006).

Uma proteína de forma espiralada (a α -queratina) é que dá sustentação ao cabelo, a qual fica imersa na matriz (Pozebon, D. et al., 1999). A α -queratina é constituída por uma sequência de 15 a 22 tipos de aminoácidos, principalmente cisteína.

O cabelo humano é um sistema de acumulação de elementos vestigiais, em que a absorção dos elementos dá-se a partir da raiz, cuja quantidade incorporada depende da concentração nos fluidos biológicos circundantes (sangue, linfa e fluido extracelular) (Almeida, A. et al., 1999; Pozebon, D. et al., 1999). Os elementos vestigiais irão fixar-se à queratina do cabelo ligados a átomos de enxofre em cisteínas, ou em alguns casos, à membrana das células por ligação com os grupos SH (Chojnacka, K. et al., 2005; Senofonte, O., et al., 2001). Um período de aproximadamente trinta dias decorre entre a absorção e o equilíbrio dos elementos vestigiais no cabelo.

As concentrações de elementos vestigiais no cabelo são afetadas pela exposição ambiental, mas também variam com diversos fatores, incluindo hábitos alimentares, os processos metabólicos, doenças, consumo de drogas, utilização de cosméticos, a região geográfica, a concentração dos elementos nos alimentos e bebidas (como por exemplo, na água e no vinho) (Gil, F. et al., 2011; Olmedo, P. et al., 2010). Assim, quando se analisa uma determinada amostra de cabelo é necessário ter em conta todos os hábitos e

informações sobre a pessoa em questão.

O interesse na análise de cabelo humano para a determinação de elementos vestigiais tem aumentado devido a certas vantagens oferecidas por esta amostra em relação a outras: (i) as concentrações da maioria dos elementos são maiores no cabelo do que em outras matrizes biológicas; (ii) as amostras de cabelo são mais simples de recolher, transportar e armazenar; (iii) o caráter menos invasivo dos procedimentos de recolha de cabelo; e (iv) a capacidade de acumular metais no cabelo durante períodos prolongados (Pragst, F. and Balikova, M. A., 2006; Rao, K., et al., 2002).

A determinação de elementos vestigiais no cabelo mostra características interessantes para a deteção precoce de efeitos adversos sobre a saúde humana, resultando numa ferramenta de diagnóstico clínico (Senofonte, O., et al., 2001). Outros estudos sobre a determinação de elementos vestigiais em cabelo têm demonstrado relações entre um certo estado nutricional em função dos hábitos alimentares e as concentrações dos elementos no cabelo (Bermejo-Barrera, P., et al., 2002; Chojnacka, K. et al., 2005).

A análise de cabelo é particularmente importante em investigações forenses para demonstrar estados de intoxicação ou envenenamento, seja em indivíduos vivos ou em cadáveres (Morton, J. et al., 2002).

O cabelo é considerado pela EPA e pela IAEA um dos materiais biológicos mais importantes para a monitorização ambiental, nutricional e ocupacional de metais (Gil, F. et al., 2011).

1.2.5. Unhas

Apesar de atualmente ser atribuído um papel basicamente estético às unhas, estas desempenham várias funções importantes, sendo umas delas proteger as pontas dos dedos das mãos e dos pés de todo o tipo de agressões (Brown, M. B. et al., 2009). Servem ainda a outro importante propósito, funcionando como uma espécie de sistema de alerta, pois muitas vezes é nelas que os sinais exteriores de doenças se podem desenvolver.

Ainda que a taxa de crescimento das unhas seja variável entre os indivíduos, as unhas das mãos crescem a uma média de 0,1 mm por dia e estima-se que as unhas dos pés cresçam 0,03 a 0,05 mm por dia, no entanto, vários fatores, fisiológicos ou outros,

influenciam o crescimento (Slotnick, M. J. and Nriagu, J. O., 2006).

A água faz parte da constituição das unhas, embora em baixa quantidade (18%) (Bega, A., 2006). O conteúdo lipídico da unha também é baixo (0,1-1%), sendo o colesterol o principal lípido encontrado (Walters, K. A. et al., 2012). Os minerais também são componentes importantes das unhas, em que elementos como Ca, Mg, Na, Fe, Cu e Zn são encontrados nelas (Walters, K. A. et al., 2012).

As unhas são compostas por camadas de queratina, proteína rica em cisteína também encontrada no cabelo e na pele (Walters, K. A. et al., 2012). O enxofre está presente principalmente nas ligações SH das cisteínas, ligando as fibras de queratina (Walters, K. A. et al., 2012).

O interesse em utilizar unhas humanas como biomarcadores da exposição a metais, baseia-se no facto de que, muitos elementos se ligam à queratina, as proteínas que contêm ligações SH presentes nas unhas (Slotnick, M. J. and Nriagu, J. O., 2006).

A janela de tempo de exposição refletida pelas unhas é dependente do comprimento do corte e da taxa de crescimento das mesmas (Slotnick, M. J. and Nriagu, J. O., 2006). Assim, dependendo da taxa de crescimento e do comprimento, as unhas refletem exposições que tenham ocorrido durante os últimos 6 a 12 meses antes do corte e ao contrário da urina, e tal como o cabelo é um marcador de períodos de exposição mais longos (Slotnick, M. J. and Nriagu, J. O., 2006).

São vários os fatores que afetam o conteúdo dos elementos nessa matriz, tais como os hábitos alimentares, o metabolismo, o estilo de vida, o meio ambiente, idade, sexo, o consumo de tabaco, etc. (Hussein Were, F. et al., 2008; Slotnick, M. J. and Nriagu, J. O., 2006). É assim difícil estabelecer valores de referência para os elementos nas unhas, pois os fatores acima impõem restrições sobre a interpretação dos resultados.

As unhas são uma ferramenta de diagnóstico interessante para avaliar a exposição a metais, especialmente porque a amostragem é simples e não-invasiva e devido ao seu fácil armazenamento (Batista, B. L. et al., 2008; Hussein Were, F. et al., 2008). Também é um substrato interessante devido à sua taxa de crescimento lento, tornando-as úteis para a análise retrospectiva (Daniel, C. R. et al., 2004).

A análise química das unhas é realizada principalmente em medicina forense, para determinar intoxicação por metais, mas também em medicina geral e ambiental, para

diagnóstico e prevenção de doenças (Daniel, C. R. et al., 2004; Mehra, R. and Juneja, M., 2005; Sukumar, A. and Subramanian, R., 2007).

1.3. Metais

Os metais são provavelmente o grupo de substâncias tóxicas conhecidas mais antigas (Gouille, J. P. et al., 2005). Estes elementos estão presentes no planeta como constituintes naturais dos solos, bem como em muitos produtos e utensílios que manuseamos (Souza, M., et al., 2009). A industrialização, o tráfego de veículos, a incineração de resíduos e o uso de fertilizantes e pesticidas resultaram no aumento de metais no meio ambiente, podendo contaminar o ar, a água, o solo e as plantas e, por conseguinte, os animais e o próprio Homem (Mehra, R. and Juneja, M., 2005; Souza, M., et al., 2009).

Alguns elementos essenciais aos organismos vivos (Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Se, entre outros) são necessários em quantidades vestigiais para diversos processos fisiológicos, mas em concentrações mais elevadas, tendem a ser tóxicos (Amaral, A. F. et al., 2008; Catarino, S. et al., 2008; Mehra, R. and Juneja, M., 2005). No entanto, a essencialidade ou toxicidade de um elemento está diretamente relacionada com a concentração em que este se apresenta (Catarino, S. et al., 2008).

1.3.1. Cobre

Sendo o Cu o terceiro mineral mais abundante do nosso organismo, este é considerado um elemento vestigial essencial necessário para a síntese de hemoglobina, no metabolismo de enzimas e essencial para a absorção de Fe (Kaluza, J. et al., 2001). Todavia, o Cu em excesso pode ser extremamente tóxico, sendo que a acumulação em demasia deste nos tecidos pode causar uma disfunção genética conhecida como doença de Wilson, caracterizada por degeneração do fígado e alterações cerebrais.

A toxicidade de Cu ocorre mais frequentemente pelo consumo de alimentos contaminados com este elemento, a partir da exposição a excesso de Cu em fontes ambientais, como água e solo e a partir de exposição ocupacional. Os sintomas de intoxicação por Cu incluem náuseas, vômitos, diarreia, dores musculares e abdominais,

danos no fígado, rins e danos cerebrais (Provenzano, M. R. et al., 2010).

O Cu é absorvido principalmente através do trato gastrointestinal e, é excretado parcialmente através das fezes e da urina (Provenzano, M. R. et al., 2010). Outra parte é armazenada no fígado, cérebro, unhas, cabelo e ossos (Garcia-Esparza, M. A. et al., 2006). Os níveis de Cu no organismo são influenciados por diversas condições, principalmente condições fisiológicas e patológicas, como gravidez, disfunção renal e doenças hepáticas (Cornelis, R. et al., 1996).

Este é um elemento que pode facilmente acumular-se no solo e isto resulta em grande parte da poluição antropogénica, como por exemplo a utilização de fertilizantes e pesticidas, resíduos urbanos, atividades industriais e mineiras, podendo também estar associado a incêndios florestais (Reimann, C. and Caritat, P., 1998).

Os teores elevados de Cu estão essencialmente presentes em alguns tipos de rochas, como argilitos e xistos (Reimann, C. and Caritat, P., 1998). A disponibilidade deste elemento nos solos é influenciada por diversos fatores, incluindo o pH, o teor em matéria orgânica e a interação com outros elementos, como o Fe. Dentre os micronutrientes, o Cu é o que apresenta menor mobilidade no solo, tendo portanto tendência para se acumular nas camadas superficiais (Ribeiro, A., 1992).

O Cu é considerado um micronutriente essencial para as plantas, no entanto, o excesso de Cu nos solos pode ser prejudicial para as mesmas (Cruz, N., 2011). Iões de Cu são fortemente absorvidos pelas raízes, inibindo a absorção de elementos vestigiais, principalmente de Fe. Um excesso de Cu no solo pode também provocar deficiências em Zn e vice-versa.

A presença deste metal nos vinhos pode ter origem exógena e endógena. Deve-se à própria constituição das uvas e do solo, mas também devido a tratamentos cúpricos, refletindo-se na predominância do elemento sob a forma iónica, que poderá explicar a elevada capacidade deste ser assimilado (Catarino, S. et al., 2008; Provenzano, M. R. et al., 2010). Altos níveis de Cu podem deteriorar a qualidade do vinho (Garcia-Esparza, M. A. et al., 2006).

Como visto anteriormente, tanto a deficiência em Cu como o excesso produzem efeitos adversos, e por isso a monitorização das concentrações de Cu no ambiente (água, solo, alimentos, etc.) e em matrizes biológicas é de importância crucial.

1.3.2. Ferro

O Fe tem variadas funções no organismo, por exemplo, a hemoglobina, que contém Fe, permite o transporte de oxigénio através do sistema circulatório (Harrison, P. and Arosio, P., 1996; Pinto, G., 2008). A homeostase do Fe é dependente da quantidade que é absorvida, sendo que este pode acumular-se em diversos tecidos (Harrison, P. and Arosio, P., 1996).

Concentrações de Fe em excesso no organismo, seja devido a dieta demasiado rica em Fe ou contaminação ambiental ou ocupacional, podem causar intoxicações. Como efeitos tóxicos pode causar diarreia, vómitos, lesões hepáticas, insuficiência renal, podendo evoluir para coma e morte (Pinto, G., 2008). O Fe é também um potencial cancerígeno, sendo associado com o cancro do fígado (Toyokuni, S., 2009).

O Fe, dentre os metais, é o elemento mais abundante nos solos. Está associado a todos os tipos de rocha mas é particularmente abundante em rochas ultramáficas e máficas (muito ricas ou ricas em Fe e Mg) (Almeida, L., 2005). A presença de Fe no solo tem origem natural mas também tem origem antropogénica. Entre as fontes antropogénicas de Fe estão as emissões pelas atividades industriais, os efluentes de esgotos municipais e industriais, e o uso de fertilizantes.

O estado de oxidação, Fe (II) ou Fe (III) e a forma físico-química determinam o comportamento do Fe no meio ambiente e a sua biodisponibilidade. O crescimento das plantas é sensível às alterações do solo no que respeita à disponibilidade do Fe, acrescido do facto desse fenómeno estar dependente do pH, da concentração em fosfatos e em certos metais, entre os quais o Co.

O Fe é encontrado em quantidades substanciais em todas as variedades de uvas e de vinhos (Fiket, Ž. et al., 2011; Riganakosa, K. and Veltsistas, P., 2003). A concentração deste elemento nas uvas e vinhos depende de diversos fatores, sendo o mais importante o solo das vinhas. Assim, o elemento Fe pode ser um possível marcador da origem geográfica da proveniência dos vinhos (Lara, R. et al., 2005).

A baixas concentrações, o Fe desempenha um importante papel nos processos de fermentação dos vinhos (Catarino, S. et al., 2008; Stafilov, T. and Karadjova, I., 2009). Por outro lado, grandes quantidades deste elemento podem causar formação de turvações e

precipitados (Baysal, A. and Akman, S., 2011). Por isso, a avaliação das concentrações de Fe em vinhos é de grande importância devido às alterações na qualidade que este pode causar (Fiket, Ž. et al., 2011).

1.3.3. Níquel

A população em geral pode ser exposta ao Ni através do solo, do ar, da água, dos alimentos, implantes dentários, cosméticos, consumo de tabaco, fertilizantes e incineração de resíduos (Michalak, I. et al., 2012; Reimann, C. and Caritat, P., 1998).

O Ni e os seus compostos são absorvidos pelo corpo humano por diferentes vias - inalação, ingestão e via dérmica e são excretados através da urina, ou acumulados nos ossos, fígado, rins e cabelo (Cornelis, R. et al., 1996; Michalak, I. et al., 2012). A acumulação em excesso de Ni no organismo representa um sério risco à saúde humana, uma vez que pode causar alergias, diarreia, vômitos, fibrose pulmonar e necrose do fígado (Horng, C.-J., et al., 2002). O maior perigo da exposição crónica a este elemento é o cancro do pulmão, nasal ou da laringe (Horng, C.-J., et al., 2002).

O Ni ocorre naturalmente em vários tipos de solos e rochas. É um metal pesado, que é particularmente abundante em rochas ultramáficas (Almeida, L., 2005). A concentração de Ni pode sofrer um acréscimo em solos que se encontrem sujeitos a inúmeras atividades humanas, como emissões industriais, deposição de resíduos urbanos, tráfego automóvel, aplicação de fertilizantes fosfatados e pesticidas (Cruz, N., 2011).

A mobilidade do Ni nos solos é inversa ao valor do pH, daí que solos com valores de pH menores apresentem uma maior mobilidade deste elemento (Cruz, N., 2011). A disponibilidade deste elemento nos solos para as plantas pode também ser afetada por propriedades como o teor em matéria orgânica (Cruz, N., 2011).

A presença de Ni nos vinhos pode ter origem endógena e exógena, sendo que a presença endógena de Ni deve-se à absorção radicular (Catarino, S. et al., 2008). Potenciais fontes exógenas de Ni são a contaminação atmosférica, equipamentos utilizados na produção e armazenamento do vinho e a conservação em garrafa (devido aos pigmentos que podem conter Ni) (Catarino, S. et al., 2008).

1.3.4. Zinco

O Zn é um elemento vestigial que se apresenta distribuído no meio ambiente, sendo encontrado no ar, solo, água e alimentos. Este é um elemento metálico de extrema importância para as funções biológicas dos seres vivos. Nos humanos, o Zn é essencial para o bom funcionamento dos sistemas imunológico, digestivo e nervoso (Cruz, N., 2011).

A absorção excessiva de Zn pelo organismo pode levar a um quadro de intoxicação, resultando em sintomas como vômitos, diarreia, cólicas, anemia, edema pulmonar e danos no fígado ou nos rins, podendo também ser neurotóxico (Senofonte, O., et al., 2001).

O Zn está naturalmente associado a todos os tipos de rocha mas é particularmente importante nos basaltos, argilitos e xistos (Almeida, L., 2005; Reimann, C. and Caritat, P., 1998). Algumas fontes de contaminação de Zn, como o tráfego automóvel, as emissões industriais, os efluentes urbanos, fertilizantes e pesticidas, são apontadas como as principais responsáveis pelo aumento da sua concentração no solo (Almeida, L., 2005; Cruz, N., 2011).

No solo, o Zn é um dos metais mais móveis e a sua acumulação parece não ser significativa (Catarino, S. et al., 2008). Quanto ao seu comportamento no solo, é referido em alguns estudos que a sua adsorção está dependente de diversos fatores, entre os quais o pH, o teor de matéria orgânica e de argila (Cruz, N., 2011). A mobilidade do Zn é elevada sob condições de oxidação em meio ácido e muito baixa em ambiente neutro e alcalino (Reimann, C. and Caritat, P., 1998).

O Zn é considerado um nutriente essencial para o crescimento das videiras e, consequentemente, presente no vinho em concentrações relativamente elevadas (Galani-Nikolakaki, S. et al., 2002). Para além da natureza endógena, é também de referir, como significativa, a resultante do contacto com materiais contendo Zn, durante as fases de processamento e envelhecimento do vinho e ainda a resultante da aplicação de fungicidas (Catarino, S. et al., 2008; Galani-Nikolakaki, S. et al., 2002).

Não obstante os teores de Zn normalmente encontrados no vinho serem demasiado reduzidos para provocar intoxicações, este metal é reconhecido pela sua potencial ação tóxica sobre o organismo humano e por se encontrar na origem de acidentes de estabilidade físico-químicos do vinho, sendo assim importante a sua análise química (Catarino, S. et al.,

2002; Catarino, S. et al., 2008).

1.4. Análise quantitativa de metais

Tem havido um progresso constante na metodologia de diversas técnicas analíticas, para determinação e quantificação de metais, numa grande variedade de amostras (Sardans, J. et al., 2010).

Em geral, as amostras não podem ser analisadas sem uma preparação preliminar. No caso dos metais, um tratamento da amostra é frequentemente necessário. O tratamento da amostra é utilizado para destruir a matéria orgânica, de modo a reduzir interferências causadas por esta e para extrair os iões metálicos ligados a complexos orgânicos e inorgânicos (Eaton, A. D., et al., 2005; Stafilov, T. and Karadjova, I., 2009). Os métodos mais utilizados na decomposição das amostras são a digestão na placa e a digestão no micro-ondas, sendo a digestão ácida a mais comumente utilizada.

Várias técnicas analíticas estão disponíveis e, seleccionar a mais adequada é a chave para alcançar resultados precisos, fiáveis e reais (Eaton, A. D., et al., 2005). A seleção apropriada requer um conhecimento básico de cada técnica, assim como dos seus pontos fortes e limitações (PerkinElmer, 2009).

Os métodos mais comuns usados atualmente na determinação de metais envolvem técnicas espectrométricas altamente sensíveis como ICP-AES e a Espectrometria de Absorção Atómica (FAAS, GFAAS, etc.) (Sastre, J., et al., 2002).

1.4.1. ICP-AES

Na Espectrometria de Emissão Atómica a amostra é submetida a altas temperaturas, causando a dissociação e a excitação (ou ionização) dos átomos da amostra (Boss, C. B. and Fredeen, K. J., 1989; Csuros, M. and Csuros, C., 2000). Como os átomos se encontram num estado de energia superior (estado excitado), a tendência é voltar ao estado de energia mais baixo (estado fundamental), emitindo energia, que é detetada (Csuros, M. and Csuros, C., 2000). A intensidade da radiação, emitida num comprimento de onda específico por esses átomos ou iões, é proporcional à concentração do elemento na amostra (Krull, U. J., et al.; Thermo Elemental, 2001).

A grande maioria das análises em ICP-AES é realizada em amostras líquidas e a fonte de energia que assegura a passagem das amostras líquidas ao estado de vapor atômico é o plasma, sendo este um gás inerte parcialmente ionizado, o árgon (Lindon, J. et al., 2000; Murray, R. W. et al., 2000). No plasma, as amostras são transportadas sob a forma de aerossol, que consiste em pequenas gotículas (Lindon, J. et al., 2000). Para que as amostras cheguem ao plasma na forma de aerossol, é necessária a utilização de um nebulizador, cuja função é converter a amostra aquosa num aerossol, com a ajuda de um gás de arraste, o árgon (Charana, A. P. M., 2008; Dean, J. R., 1997). A amostra é então transportada até ao plasma no topo da *torch* pelo árgon, em que a ionização deste é iniciada por uma faísca (Analytik Jena AG). No plasma, os átomos e, particularmente, os iões são excitados por emissão. Em seguida, a luz que é emitida é dirigida para as redes de difração, as quais dispersam o feixe policromático de luz nos comprimentos de onda que o constituem (Boumans, P. W., 1987). O espectrómetro vai separar a radiação em linhas espectrais, onde cada linha espectral é atribuída a um elemento presente na amostra (Boumans, P. W., 1987; Skoog, D. A. et al., 2000). Medindo a intensidade das linhas espectrais seleccionadas, o espectrómetro dá informação quantitativa da concentração de cada elemento presente na amostra (Boumans, P. W., 1987).

Para a análise de elementos metálicos, ICP-AES é uma das técnicas eleitas, apresentando diversas vantagens: capacidade multi-elementar, boa gama de linearidade, baixos limites de deteção para a maioria dos elementos, elevada precisão, alta sensibilidade, rapidez de resposta e possibilidade de automatização (Santos, E. J. and Oliveira, E., 2001; Senofonte, O. et al., 2000; Thermo Elemental, 2001).

O procedimento de introdução/nebulização da amostra no plasma pode produzir interferências não-espectrais, sendo estas largamente limitadas a interferências de transporte (Analytik Jena AG). Uma outra desvantagem da técnica de ICP-AES é a nível económico, uma vez que o custo da instrumentação é elevado e o sistema de operação é bastante mais dispendioso do que qualquer instrumento AAS, principalmente devido ao consumo de árgon.

O ICP-AES é uma técnica excelente para a determinação de elementos maiores, menores e vestigiais, numa grande variedade de amostras, como amostras orgânicas, geológicas, ambientais e alimentos (Santos, E. J. and Oliveira, E., 2001). A capacidade

desta técnica detetar vários elementos ao mesmo tempo melhora a sua utilidade na análise forense (Krull, U. J., et al.).

1.4.2. FAAS

A Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização em Chama, FAAS, pode ser utilizada para determinar a concentração da maioria dos metais.

A absorção atômica mede a concentração dos átomos de um elemento passando luz, emitida por uma lâmpada de cátodo oco desse elemento, por meio de uma nuvem de átomos formada a partir da amostra (Thermo Elemental, 2001). A lâmpada de cátodo oco é uma fonte de luz usada para gerar radiação no comprimento de onda característico de cada elemento. Assim, a absorção atômica ocorre quando um átomo no estado fundamental absorve energia de um comprimento de onda específico e é elevado a um estado excitado (Thermo Elemental, 2001). A absorção atômica fornece a medida de unidade óptica (unidades de absorvância), posteriormente convertida em unidades de concentração, de forma a obter-se um resultado analítico, existindo assim uma relação linear entre a absorvância e a concentração (Catarino, S. et al., 2002).

O princípio da técnica de FAAS baseia-se em que a irradiação da chama por um feixe de energia específico, proveniente de uma lâmpada de cátodo oco, provoca a transição eletrónica dos átomos do analito levando à sua excitação eletrónica, permitindo a leitura da absorvância, correspondente à energia absorvida pelos átomos (Brown, R. J. C. and Milton, M. J. T., 2005).

Em FAAS, a amostra é introduzida como um aerossol na chama (PerkinElmer, 2009). A chama mais frequentemente utilizada é a chama de ar/acetileno, que é utilizada para evaporar o solvente e dissociar a amostra nos átomos que a compõem (Thermo Elemental, 2001). Com um nebulizador, operando pela ação do fluxo de gás comprimido, a solução da amostra é aspirada e nebulizada na forma de um aerossol numa câmara de nebulização (Eaton, A. D., et al., 2005; Krug, F. et al., 2004). A evaporação do solvente das gotículas na chama é denominada dessolvatação, produzindo um aerossol seco (suspensão de partículas sólidas) (Krug, F. et al., 2004). Sob elevadas temperaturas no ambiente da chama, segue-se a volatilização destas partículas (Krug, F. et al., 2004). Em seguida, um

feixe de luz é dirigido através da chama, para um monocromador, que isola o comprimento de onda específico de luz a ser medida, e para um detetor, que mede a quantidade de luz absorvida pelo elemento atomizado na chama (Eaton, A. D., et al., 2005; Thermo Elemental, 2001). A quantidade de energia, no comprimento de onda característico, absorvida pela chama, é proporcional à concentração do elemento na amostra (Eaton, A. D., et al., 2005).

A técnica de FAAS apesar de ser uma técnica rápida, de baixo custo e ter boa precisão apresenta algumas limitações, que incluem: limites de detecção moderados/altos, baixa sensibilidade, análise mono-elemento, baixa eficiência (apenas uma pequena parte da amostra atinge a chama) e são necessários volumes de amostra relativamente grandes (PerkinElmer, 2009; Thermo Elemental, 2001).

Múltiplas fontes de interferência podem causar inexatidão na determinação de elementos por FAAS, podendo ocorrer interferências físicas, químicas, espectrais, de ionização, de transporte e interferências de fundo. O tipo mais problemático de interferência é a interferência química e pode ocorrer quando a chama não é suficientemente quente para dissociar as moléculas (Eaton, A. D., et al., 2005).

A técnica de FAAS pode ser utilizada na determinação de metais em produtos farmacêuticos, água, matrizes biológicas, entre muitas outras.

1.4.3. GFAAS

A Espectrometria de Absorção Atômica em Câmara de Grafite (GFAAS), também designada Espectrometria de Absorção Atômica Eletrotérmica (ETAAS) é uma técnica altamente sensível para a determinação de metais (Sardans, J. et al., 2010).

GFAAS funciona com o mesmo princípio da técnica de FAAS, excepto que uma câmara de grafite é aquecida. A irradiação da câmara de grafite por um feixe de energia específica, proveniente de uma lâmpada de cátodo oco, fornece a energia térmica para quebrar ligações químicas dentro da amostra e produzir átomos livres no estado fundamental. Os átomos no estado fundamental são capazes de absorver energia, na forma de luz, e são conduzidos a um estado excitado, permitindo a leitura da absorvância, correspondente à energia absorvida pelos átomos.

Depois de o instrumento ter sido calibrado, uma pequena alíquota de amostra no estado líquido é introduzida na abertura da câmara de grafite. A amostra é vaporizada na câmara de grafite aquecida e a quantidade de energia luminosa absorvida na forma de vapor é proporcional às concentrações atômicas (Krull, U. J., et al.). A análise de cada amostra leva cerca de um a cinco minutos e os resultados de uma amostra são a média das análises realizadas.

Como já dito, a câmara de grafite é submetida a um aquecimento progressivo previamente programado (PerkinElmer, 2009). O programa de temperaturas tem de ser otimizado para cada analito e para cada tipo de matriz e geralmente consiste nas seguintes fases (Analytik Jena AG):

- 1) **Secagem**, para a evaporação do solvente;
- 2) **Pirólise**, pré-tratamento térmico. A finalidade desta etapa é remover os componentes da matriz, que são mais voláteis do que os compostos químicos do analito, de modo a reduzir ou eliminar interferências;
- 3) **Atomização**, nesta etapa determina-se a energia que é necessária para os átomos passarem do estado fundamental ao estado excitado;
- 4) **Limpeza da câmara de grafite**, a fim de volatilizar resíduos que tenham ficado no tubo de grafite.

As vantagens de GFAAS incluem: baixos limites de detecção, pequenas quantidades de amostra, possibilidade de automatização e menos interferências que em FAAS (Štupar, J. and Dolinšek, F., 1996; Thermo Elemental, 2001). Apresenta também algumas desvantagens: análise mono-elemento, gama de linearidade reduzida, tempo de análise mais longo que em FAAS e ICP-AES e altas interferências de matriz (Thermo Elemental, 2001).

Em GFAAS, as interferências podem ser classificadas em físicas e químicas. Alterações na introdução da amostra, absorção de fundo e efeitos de memória podem originar efeitos de interferências físicas e as interferências químicas podem ser causadas por reação do analito com os componentes da matriz (Thermo Elemental, 2001).

Uma pesquisa na literatura sobre a determinação de elementos como Cu, Fe, Ni e Zn por GFAAS, indica uma grande popularidade desta técnica na análise de amostras biológicas, alimentos, água, etc.

1.5. Descrição da região de recolha das amostras

A região escolhida para a recolha das amostras utilizadas neste projeto foi a cidade de Macedo de Cavaleiros e algumas aldeias pertencentes ao concelho - Grijó, Morais e Sobreda. A escolha desta região foi feita com base nesta ser a minha terra natal, sendo uma vantagem na recolha das amostras e também porque esta região apresenta um grande cultivo de vinha e produção de vinho caseiro, o que tornaria mais fácil a ligação com os solos e com as pessoas.

Macedo de Cavaleiros e as aldeias de Grijó, Morais e Sobreda situadas no centro do nordeste transmontano, pertencem ao distrito de Bragança e à região de Trás-os-Montes, na zona Norte de Portugal.

No concelho de Macedo de Cavaleiros a agricultura continua a ser a maior fonte de subsistência da população dos meios rurais, e embora com menor expressão, a pecuária e a silvicultura também se praticam (Berliner, A., et al., 2004). Existem ainda pequenas unidades como minas, pedreiras e serrações, que apesar de um bom contributo económico para a região, podem causar impactos negativos no ambiente (Berliner, A., et al., 2004).



Figura 1 - Mapa de freguesias do concelho de Macedo de Cavaleiros e freguesias assinaladas onde foram recolhidas as amostras (Adaptado de AMTQT (2004)).

O território de Macedo de Cavaleiros encontra-se em pleno planalto transmontano,

com altitudes compreendidas entre 400 e 800 m (Pires, A., 1963). As condições climáticas e a fertilidade do solo fazem do concelho um bom produtor de excelentes vinhos, cereais, azeite e castanha.

O concelho de Macedo de Cavaleiros é uma zona de solos ácidos essencialmente formados por xistos pré-câmbrios, com algumas zonas graníticas, existindo numa pequena área manchas calcárias (Instituto da Vinha e do Vinho; Marques, A. S., et al.). Esta região tem das formações geológicas mais importantes de Portugal, o Maciço de Morais (Pereira, E.). A história geológica deste local remonta ao período de 300 milhões de anos, muito anterior à extinção dos dinossauros, quando os dois enormes continentes Gondwana e Laurússia chocaram, fechando o oceano Rheic (Pereira, E.). Em termos geológicos, tem rochas de grande diversidade, permitindo a nível ecológico uma multiplicidade de organismos e seres vivos, com elevada adaptação a solos ricos em metais pesados e pobre em matéria orgânica. O Maciço de Morais compreende rochas ultramáficas e máficas com solos ricos em Cr, Fe e Ni (Berliner, A., et al., 2004; Pereira, E.).

Na região de Trás-os-Montes o cultivo da vinha é secular. Em geral, não há plantações em grande escala, mas todas as explorações visam pelo menos o seu autoabastecimento (Pires, A., 1963).

No que respeita ao carácter dos vinhos de Trás-os-Montes são, em geral, macios, aromáticos e mais ou menos acídulos e o teor alcoólico dos vinhos da região oscila entre os 11,7 e 16,7% Vol. (Pires, A., 1963). Há mesmo algumas zonas de Trás-os-Montes que produzem vinhos de excepcional qualidade.

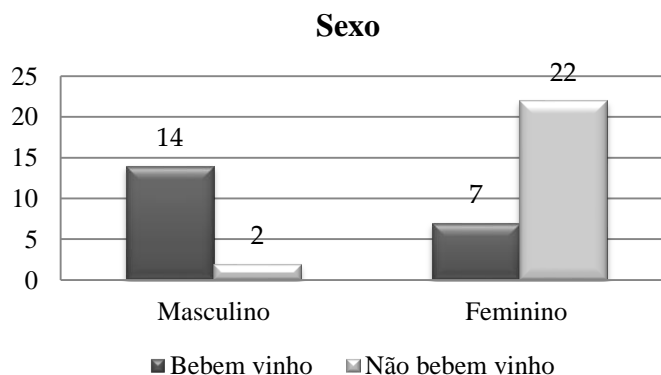
CAPÍTULO 2 - APRESENTAÇÃO DE RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para análise estatística dos dados obtidos foi utilizado o programa estatístico IBM SPSS Statistics - versão 21.0.

2.1. Caracterização da amostra

Neste estudo, composto por quarenta e cinco pessoas, vinte e uma bebem vinho e vinte e quatro pessoas não bebem vinho. Segundo os questionários e como se pode observar pelo Gráfico 1, a maioria das pessoas que bebem vinho são homens e a maioria das pessoas que não bebem vinho são mulheres.

Gráfico 1 - Gráfico que apresenta a estatística das pessoas que bebem vinho e que não bebem vinho relacionada com o sexo dos mesmos.



A maioria das pessoas deste estudo é reformada (44,4%), mas praticamente todas as pessoas (86,7%) tem uma atividade agrícola, produzindo produtos hortícolas para consumo próprio.

Das pessoas a que foi feita a recolha de cabelo nenhuma delas pinta o cabelo. Em termos de pintar as unhas, 15,6% das pessoas pintam. Apenas uma pessoa fuma, sendo que esta não bebe vinho.

Por análise dos questionários realizados, verifica-se que a maioria das pessoas deste estudo tem doenças (60%), independentemente de beberem ou não vinho, sendo que 22,2% das pessoas sofrem de hipertensão, 17,8% das pessoas têm diabetes e 15,6% têm colesterol elevado, sendo estas três as doenças que predominam na amostra de estudo. Também a maioria das pessoas toma medicamentos (71,1%).

Um dos pontos importantes deste estudo é que para estabelecer uma correlação

entre o solo, o vinho e o ser humano, é fundamental que as pessoas consumissem regularmente o mesmo vinho. A maioria das pessoas que bebe vinho ingere esta bebida, duas ou mais vezes por dia (76,2%), principalmente às refeições e cerca de um copo (52,4%).

Todas as pessoas deste estudo que bebem vinho têm vinhas e produzem o próprio vinho, requisito essencial para que se pudesse recolher o solo das vinhas e o vinho produzido. À exceção de apenas uma das vinhas que se situa na cidade perto de estradas com algum tráfego automóvel, as restantes situam-se no campo, longe de meios poluídos. Dos tratamentos feitos às vinhas, das vinte e uma pessoas, todas elas efetuam lavragens, dezoito fazem tratamentos com pesticidas (incluindo inseticidas e fungicidas, como calda bordalesa e enxofre), dezasseis adubam e onze estrumam as vinhas.

Uma outra questão é a proveniência da água que as pessoas bebem, ao que 53,3% das pessoas respondeu que é água da torneira.

Todas as informações dos questionários são importantes para avaliar os fatores que poderão influenciar as concentrações de metais encontradas na análise química das amostras recolhidas.

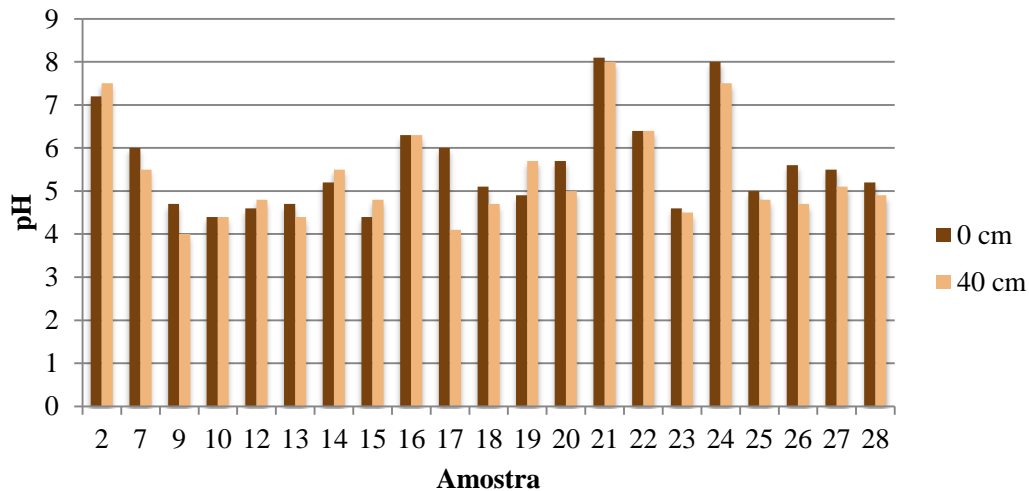
2.2. Solo

2.2.1. pH

Os valores obtidos para o pH das amostras de solo encontram-se em anexo (Anexo II). O zero pH medido foi de 6,772 e a sensibilidade foi de 98,3%, o que significa que o eletrodo de pH tem boa performance.

O Gráfico 2 apresenta o pH obtido para as amostras de solo à superfície (0 cm) e em profundidade (40 cm).

Gráfico 2 - Valores de pH obtidos para as amostras de solo, à superfície e em profundidade.



Por observação do gráfico anterior e da Tabela 1 pode comparar-se o pH dos solos à superfície e em profundidade e pode concluir-se que, não se observam diferenças relevantes do pH entre as duas profundidades de solo mas em termos gerais, o pH é ligeiramente superior à superfície do que em profundidade no solo das vinhas. O pH mais baixo obtido foi de 4,0 e o pH mais elevado foi de 8,1. Podemos classificar a maior parte dos solos deste estudo em ácidos, apresentando de forma geral pH inferiores a 7.

Tabela 1 - Valores de pH dos solos.

	n	Mínimo	Máximo	Média
pH solo 0 cm	21	4,4	8,1	5,6
pH solo 40 cm	21	4,0	8,0	5,4

De acordo com a distribuição geográfica de classes de pH dos solos em Portugal descrita por Freitas, F. (1984), a região norte do país, onde se inclui a área de estudo, apresenta valores de pH entre 4 e 8,5, o que vai de encontro aos resultados obtidos neste trabalho. E tal como visto na descrição da região de recolha das amostras, os solos da região de Macedo de Cavaleiros são em geral ácidos, formados por rochas máficas e ultramáficas. Contudo, o pH do solo, além de depender do material originário, da textura do solo, da quantidade e composição da matéria orgânica, é condicionado por fatores que

afetam estas características, como o clima, a vegetação, o relevo e a atividade humana (Freitas, F., 1984).

2.2.2. Concentrações dos elementos no solo

O método de digestão no micro-ondas utilizado para tratamento das amostras de solo com adição de HNO₃ e H₂O₂ mostrou ser um método rápido, adequado e eficiente na digestão destas amostras, destruindo por completo a matéria orgânica.

As percentagens de recuperação obtidas para as amostras fortificadas de Ni foram entre 89% e 117% e para os elementos Cu, Fe e Zn foram entre 90 e 122%. Os desvios duplicados obtidos foram inferiores a 15%, como pretendido.

Na Tabela 2 são apresentadas as concentrações obtidas para os elementos Zn, Cu, Fe e Ni nas amostras de solo analisadas.

Tabela 2 - Concentrações de Zn, Cu, Fe e Ni obtidas para as amostras de solo.

Amostra	Profundidade (cm)	Concentração (mg/kg)			
		Zn	Cu	Fe	Ni
2	0	< LQ	< LQ	41896	91
	40	< LQ	< LQ	37800	120 *
7	0	< LQ	< LQ	36198	83 *
	40	< LQ	31	34560	91 *
9	0	< LQ	59 *	15119	< LQ
	40	< LQ	357 *	15001	14
10	0	< LQ	225 *	13543	< LQ
	40	< LQ	35	18136	14
12	0	< LQ	69 *	17027	17
	40	< LQ	45	20963	20
13	0	73	26	31676	38 *
	40	< LQ	23	30465	39 *
14	0	< LQ	23	38735	127 *
	40	< LQ	25	37255	141 *
15	0	125	56 *	44112	65 *
	40	< LQ	24	26113	32 *
16	0	< LQ	< LQ	40706	70
	40	< LQ	< LQ	30589	62
17	0	< LQ	< LQ	17125	< LQ

	40	< LQ	25	32641	18
18	0	< LQ	< LQ	9670	16
	40	< LQ	< LQ	14764	17
19	0	< LQ	23	17657	20
	40	< LQ	< LQ	8225	< LQ
20	0	< LQ	< LQ	26320	42
	40	100	34	38841	43 *
21	0	< LQ	< LQ	36091	< LQ
	40	< LQ	< LQ	31311	< LQ
22	0	< LQ	< LQ	37724	42
	40	< LQ	< LQ	52643	59
23	0	< LQ	< LQ	17481	26
	40	< LQ	< LQ	11190	16
24	0	< LQ	< LQ	27211	706 *
	40	< LQ	< LQ	78679	2142 *
25	0	< LQ	< LQ	27214	37 *
	40	< LQ	< LQ	34292	45 *
26	0	< LQ	< LQ	67456	99 *
	40	89	29	52551	57 *
27	0	< LQ	31	34743	36 *
	40	< LQ	< LQ	25375	27
28	0	< LQ	< LQ	24775	21
	40	< LQ	< LQ	21464	21

LQ - Limite de quantificação (mg/kg): Zn - 2,0; Cu - 2,0; Fe - 2,0; Ni - 0,5.

* Valores que ultrapassam os limites máximos admitidos por lei, segundo a Tabela 4.

Pode constatar-se que, para a maior parte das amostras, o elemento Zn apresenta valores inferiores ao LQ.

Tabela 3 - Estatística descritiva das concentrações de Cu, Fe, Zn e Ni nas amostras de solo obtidas neste estudo.

Elemento	Solo 0 cm (mg/kg)			Solo 40 cm (mg/kg)		
	n	Média	Gama	n	Média	Gama
Cu	8	64 ± 67,5	23 - 225	10	62,8 ± 103,6	23 - 357
Fe	21	29641,9 ± 13596,7	9760 - 67456	21	31088,5 ± 16160,1	8225 - 78679
Zn	2	99,0 ± 36,8	73 - 125	2	94,5 ± 7,8	89 - 100
Ni	17	90,4 ± 161,9	16 - 706	19	156,7 ± 482,1	14 - 2142

Por análise da tabela anterior, vemos que em geral as concentrações não diferem muito entre as duas camadas de solo. Verifica-se que para o Cu e para o Zn as concentrações são ligeiramente superiores nas amostras de solo à superfície (solo 0 cm), e para o Fe e para o Ni as concentrações são maiores nas amostras de solo em profundidade (solo 40 cm). Tal como conclui Cruz, N. (2011), constata-se que a concentração de Ni no solo aumenta com a profundidade, o que demonstra a alta mobilidade deste elemento.

Como referido no Procedimento Experimental, as diluições das amostras de solo foram feitas de acordo com o pH obtido para cada amostra (Anexo II) e os limites máximos admitidos por lei para cada elemento no solo (Tabela 4). Tal como indicado o limite máximo admissível para cada elemento depende do pH de cada solo.

Tabela 4 - Valores limite da concentração de metais nos solos em função do seu pH (Adaptado do Decreto-Lei n.º 276/2009).

Parâmetro	pH ≤ 5,5	5,5 < pH ≤ 7	pH > 7
	mg/kg de matéria seca		
Cobre	50	100	200
Níquel	30	75	110
Zinco	150	300	450
Ferro	Não existe limite		

Tal como indicado, as concentrações dos elementos Cu e Ni ultrapassam os limites legais, para algumas das amostras. Por exemplo, o resultado da amostra 24 em profundidade para o elemento Ni foi de 2142 mg/kg e esta amostra apresenta um pH de 7,5, ou seja, o limite máximo para este solo é de 110 mg/kg. Assim, este solo ultrapassa muito o limite máximo estabelecido por lei.

Pode também comparar-se os resultados obtidos neste estudo com as concentrações médias encontradas em outros estudos.

A concentração média de Cu nos solos a nível mundial é de 20 mg/kg (Mackie, K. A. et al., 2012). Contudo, nos solos superficiais portugueses, o valor para o Cu é de 16 mg/kg (Ferreira, I., 2004). Dias, R. M. S., et al. (2007) descreve no seu estudo que, nos solos agrícolas, as concentrações de Cu se situam abaixo de 20 mg/kg mas em solos de vinhas observa-se um enriquecimento dos solos com este metal (> 30 mg/kg), e que nos solos mais ricos em Cu, essa acumulação se dá na camada superficial, podendo ser um sinal de contaminação antropogénica. Outros estudos indicam que valores de Cu passíveis de ser encontrados em solos situam-se entre 2 e 250 mg Cu/kg (Ribeiro, A., 1992).

Por observação da Tabela 3 verifica-se que, em todas as amostras de solo que foi possível quantificar o elemento Cu, as concentrações deste são superiores a 23 mg/kg. No entanto para as amostras 9, 10, 12 e 15, as concentrações deste elemento são bastante mais elevadas, ultrapassando até os limites legais, o que justifica os grandes desvios padrão. De facto, a elevada concentração de Cu que por vezes é encontrada nos solos de vinhas, está sobretudo associada com a utilização de fungicidas à base de Cu, como a calda bordalesa ($\text{Ca(OH)}_2 + \text{CuSO}_4$) (Fernández-Calviño, D., et al., 2009; Komárek, M. et al., 2008; Ribeiro, A., 1992). Cu, originado a partir da aplicação de pesticidas, concentra-se principalmente nas camadas superficiais do solo e perto das videiras, devido à sua baixa mobilidade no solo, o que representa o facto de que o Cu é fortemente imobilizado pela matéria orgânica (Komárek, M. et al., 2008).

O Fe, dentre os metais, é o elemento mais abundante nos solos, variando de 10 a 100 g/kg, sendo a concentração média de 38 g/kg, o que pode ser verificado pelos resultados obtidos para as amostras de solo analisadas neste estudo.

Nos solos superficiais portugueses, o valor para o Zn é de 54,5 mg/kg (Ferreira, I., 2004). Este elemento apresenta uma concentração média nos solos a nível mundial de 63

mg/kg (Cruz, N., 2011). Um outro autor, Krauskopf, K. B. (1972) indica que a concentração de Zn em solos varia de 10 a 300 mg/kg, sendo que os poucos resultados obtidos neste trabalho se situam dentro desta gama. Contudo, foram muitas as amostras de solo que não quantificaram o elemento Zn, o que mostra que há uma deficiência em Zn na maior parte dos solos analisados. Como referido no estudo de Kalis, E. J. J. et al. (2007), o Zn pode encontrar-se ligado à matéria orgânica ou pode estabelecer ligações a outros minerais presentes nos solos, fazendo com que os solos apresentem baixas concentrações deste elemento.

De acordo com Pais, I. and Jones Junior, J. B. (1997), as concentrações de Ni nos solos variam de 1 a 200 mg/kg, o que vai de encontro à maior parte dos resultados conseguidos neste estudo para o elemento Ni. No entanto, Freitas, F. (1984) indica que nos solos superficiais portugueses, a concentração para o Ni é de 16 mg/kg, o que está relativamente abaixo dos valores obtidos.

A quase totalidade dos solos estudados apresenta concentrações de Ni que não diferem entre as duas camadas de solo. No entanto, os solos mais ricos neste elemento têm maiores concentrações a 40 cm de profundidade, relativamente à camada superficial, o que sugere uma riqueza proveniente do material originário que deu origem ao solo e não contaminação antropogénica, justificação sugerida por Dias, R. M. S., et al. (2007).

Uma vez que tal como descrito anteriormente, os solos da região estudada são constituídos por rochas máficas e ultramáficas e portanto ricos em Fe e Ni, os resultados vão de encontro ao esperado.

2.3. Vinho

A digestão ácida das amostras de vinho para análise de Cu, Fe e Zn por ICP-AES mostrou ser eficiente na digestão destas amostras. A simples diluição com HNO₃ 0,5% efetuada para análise do elemento Ni por GFAAS mostrou também ser suficiente.

Para as amostras fortificadas, as percentagens de recuperação obtidas foram entre 86 e 118% e os desvios das amostras analisadas em duplicado foram inferiores a 15%.

Tabela 5 - Concentrações de Zn, Cu, Fe e Ni obtidas na análise das amostras de vinho.

Amostra	Concentração (mg/L)			
	Zn	Cu	Fe	Ni
2	< LQ	< LQ	3,6	< LQ
7	< LQ	< LQ	3,3	< LQ
9	4,9	< LQ	4,1	< LQ
10	5,1 *	< LQ	4,4	< LQ
12	< LQ	< LQ	2,8	< LQ
13	< LQ	< LQ	5,1	< LQ
14	< LQ	< LQ	3,4	< LQ
15	< LQ	< LQ	2,9	< LQ
16	< LQ	< LQ	5,3	< LQ
17	< LQ	< LQ	2,1	< LQ
18	0,7	< LQ	5,2	< LQ
19	2,1	< LQ	5,4	< LQ
20	5,5 *	1,9 *	2,9	0,3
21	< LQ	< LQ	1,6	< LQ
22	< LQ	< LQ	1,5	< LQ
23	< LQ	< LQ	12,9	< LQ
24	< LQ	< LQ	0,8	< LQ
25	1,1	< LQ	2,1	< LQ
26	< LQ	< LQ	5,2	< LQ
27	< LQ	< LQ	2,8	< LQ
28	< LQ	0,7	1,9	< LQ

LQ - Limite de quantificação (mg/L): Zn - 0,5; Cu - 0,5; Fe - 0,5; Ni - 0,1.

* Valores que ultrapassam os limites máximos admitidos por lei, segundo a Tabela 6.

Como se pode ver pela Tabela 5, praticamente todas as amostras de vinho não quantificaram para os elementos Zn, Cu e Ni. Isto deve-se às baixas concentrações que estes elementos se apresentam na generalidade dos vinhos e também porque a técnica de ICP-AES, apesar de ser referida na literatura para análise de vinhos, apresenta contudo dificuldades na determinação de alguns elementos devido aos seus limites analíticos (Catarino, S. et al., 2008).

Tabela 6 - Limites máximos admissíveis de metais no vinho (OIV, 2011).

Parâmetro	Limite máximo admissível (mg/L)
Cobre	1
Zinco	5
Ferro	Não tem
Níquel	Não tem

Observa-se que existem alguns vinhos que ultrapassam os limites legais estabelecidos pelo OIV (Tabela 6), que são os mesmos limites máximos que a legislação nacional adoptou.

Tabela 7 - Estatística descritiva das concentrações de Cu, Fe, Zn e Ni nas amostras de vinho obtidas neste estudo.

Elemento	Vinho (mg/L)		
	n	Média	Gama
Cu	2	1,3 ± 0,85	0,7 - 1,9
Fe	21	3,8 ± 2,5	0,8 - 12,9
Zn	6	3,2 ± 2,2	0,7 - 5,5
Ni	1	0,3	0,3

Pode comparar-se as concentrações obtidas com as concentrações encontradas na literatura. Para o elemento Cu, os níveis de ocorrência situam-se entre 0,02 e 3,0 mg/L, embora geralmente a concentração de Cu em vinhos considerada segura seja abaixo de 0,3-0,5 mg/L (Catarino, S. et al., 2008; Provenzano, M. R. et al., 2010). Como se pode verificar à exceção da amostra 20, todos os vinhos cumprem a legislação e encontram-se dentro dos níveis médios de ocorrência. As possíveis fontes de Cu nos vinhos são a presença de Cu nos solos, o tratamento das videiras com fungicidas cúpricos, por exemplo, a calda bordalesa, equipamentos utilizados na vinificação, entre outros (Catarino, S. et al., 2008).

Em relação ao Fe, todas as amostras quantificaram este elemento, situando-se as concentrações entre 0,8 e 12,9 mg/L, o que vai de encontro às concentrações deste

elemento encontradas normalmente nos vinhos, entre 0,5 e 20 mg/L, valores referidos por Riganakosa, K. and Veltsistas, P. (2003). A presença de Fe no vinho é essencialmente de natureza endógena, sendo função da natureza do solo e também da própria casta (Catarino, S. et al., 2008). Para enriquecimento dos vinhos em Fe, de natureza exógena, contribuem os processos de vinificação e os diversos equipamentos utilizados, como equipamentos em aço inoxidável, pipas e cubas de metal (Baysal, A. and Akman, S., 2010; Catarino, S. et al., 2008; Garcia-Esparza, M. A. et al., 2006). No entanto, pode haver perdas significativas do conteúdo de Fe durante o processo de produção, como resultado da sua utilização pelas leveduras e dependendo das condições de oxidação-redução (Catarino, S. et al., 2008; Riganakosa, K. and Veltsistas, P., 2003). Até à presente data não existe limite legal estabelecido a nível nacional ou internacional para a concentração de Fe nos vinhos.

Para o elemento Zn, a maioria das amostras de vinho mostrou ter concentrações inferiores ao LQ, e para as restantes amostras as concentrações variam entre 0,7 e 5,5 mg/L. Contudo, duas amostras ultrapassam o limite máximo admissível (5 mg/L). Conforme indica Fabani, M. P. et al. (2010), a gama de Zn normalmente encontrada em vinhos é entre 0,06 e 5,5 mg/L, o que vai de encontro aos valores obtidos neste trabalho. As videiras absorvem Zn a partir do solo em pequenas quantidades, sendo assim o Zn é um constituinte natural das uvas e dos vinhos (Catarino, S. et al., 2002; Lado, L. R. et al., 2008). Contudo, a presença de Zn no vinho também está relacionada com a utilização de fungicidas e materiais metálicos. No entanto, parte significativa deste metal é eliminada naturalmente durante a fermentação (Galani-Nikolakaki, S. et al., 2002; Lara, R. et al., 2005).

Por último, apenas uma amostra quantificou Ni nas amostras de vinho (0,3 mg/L), que fica abaixo dos níveis de ocorrência deste elemento nos vinhos (entre 1 a 510 mg/L) indicados por Catarino, S. et al. (2008). Para a concentração de Ni nos vinhos, não existe limite legal estabelecido a nível nacional ou internacional até à presente data. A presença de Ni nos vinhos pode ter origem endógena e exógena. A presença endógena de Ni nos vinhos deve-se à absorção radicular, ou seja, depende da concentração de Ni no solo mas a utilização de equipamentos em aço inoxidável e o uso de garrafas de vidro para armazenar o vinho são apontadas como as principais fontes de contaminação exógena (Catarino, S. et al., 2008). A origem de Ni nos vinhos está também ligada à poluição atmosférica e há tendência para vinhas próximas de vias rodoviárias apresentarem maiores concentrações de

Ni.

Um ponto que deve ser focado é que as amostras de solo que mostraram ter altas concentrações de Ni, como é o caso da amostra 24, não se refletem no vinho da mesma amostra, tal como acontece para outras amostras. Isto pode significar que a videira não absorve grande parte do Ni acumulado no solo, o que pode estar relacionado com o pH do mesmo, tornando o elemento indisponível para absorção pela videira ou esta tem mecanismos de retenção dos elementos, não os passando para as uvas e por sua vez, para o vinho.

2.4. Urina

As percentagens de recuperação obtidas para as amostras de urina fortificadas foram entre 98 e 113%, e quanto aos desvios duplicados das amostras rondaram os 6%.

Tabela 8 - Concentrações de Zn, Cu e Fe obtidas na análise das amostras de urina.

Amostra	Concentração (µg/L)		
	Zn	Cu	Fe
1	1060	< LQ	< LQ
2	< LQ	< LQ	< LQ
3	974	< LQ	< LQ
4	< LQ	< LQ	< LQ
5	< LQ	< LQ	< LQ
6	< LQ	< LQ	< LQ
8	< LQ	< LQ	< LQ
10	< LQ	< LQ	< LQ
11	< LQ	< LQ	< LQ
12	< LQ	< LQ	< LQ
13	< LQ	< LQ	< LQ
14	< LQ	< LQ	< LQ
15	458	< LQ	< LQ
17	602	< LQ	< LQ
18	< LQ	< LQ	< LQ
19	< LQ	< LQ	< LQ
20	< LQ	< LQ	< LQ
21	< LQ	< LQ	< LQ
22	< LQ	< LQ	< LQ

24	< LQ	< LQ	< LQ
26	< LQ	< LQ	< LQ
27	< LQ	< LQ	< LQ
28	< LQ	< LQ	< LQ
29	< LQ	< LQ	< LQ
30	698	< LQ	< LQ
31	< LQ	< LQ	< LQ
32	< LQ	< LQ	< LQ
33	410	< LQ	< LQ
34	< LQ	< LQ	< LQ
35	< LQ	< LQ	< LQ
36	< LQ	< LQ	< LQ
38	< LQ	< LQ	< LQ
39	< LQ	< LQ	< LQ
40	< LQ	< LQ	< LQ
41	< LQ	< LQ	< LQ
42	588	< LQ	< LQ
43	< LQ	< LQ	< LQ
44	< LQ	< LQ	< LQ
45	< LQ	< LQ	< LQ
46	1014	< LQ	< LQ

LQ - Limite de quantificação ($\mu\text{g/L}$): Zn - 400; Cu - 400; Fe - 400.

Por observação da Tabela 8, pode ver-se que nenhuma das amostras de urina quantificou Fe e Cu e poucas amostras quantificaram Zn. Isto deveu-se aos LQ demasiado altos para estes elementos no equipamento de FAAS. Devido à sobrecarga de trabalho que ocorreu nos laboratórios da AEMITEQ, não foi possível determinar o elemento Ni nas amostras de urina.

De acordo com Cornelis, R. et al. (1996), as concentrações médias esperadas de Cu na urina são entre 15 e 36 $\mu\text{g/L}$. Em relação ao Fe não foi possível encontrar na literatura as concentrações médias deste elemento que ocorrem na urina.

Os resultados obtidos neste estudo em relação às concentrações médias do elemento Zn nas amostras de urina ($725,5 \mu\text{g/L} \pm 257,2$) vão de encontro aos dados de Cornelis, R. et al. (1996), que indica que as concentrações de Zn nesta matriz podem variar entre 50 a 1000 $\mu\text{g/L}$, dependendo da ingestão de Zn. Uma observação importante é que maioria das amostras de urina que quantifica Zn são amostras de urina de pessoas que não bebem vinho.

Mesmo não sendo possível analisar o elemento Ni nas amostras de urina pode ver-se na literatura que os valores de referência deste elemento na urina são inferiores a 3 µg/L (Cornelis, R. et al., 1996). Numa população sem exposição ocupacional significativa, a ingestão através da dieta é a maior fonte de exposição a Ni, dependendo também do estilo de vida, fatores dietéticos, características individuais, doenças, etc. (Cornelis, R. et al., 1996; Michalak, I. et al., 2012).

2.5. Cabelo

O método recomendado pela IAEA para lavagem das amostras de cabelo parece ser adequado para a remoção de sujidade. Morton, J. et al. (2002) diz que não há nenhuma evidência de que só remova elementos vestigiais exogenamente ligados ao cabelo. Contudo, Baysal, A. and Akman, S. (2011) indicam que, uma vez que os elementos estão vinculados a grupos funcionais no cabelo, por exemplo a átomos de enxofre em cisteínas e/ou a grupos SH, estes elementos não podem ser removidos por sucessivas lavagens e portanto, o procedimento de lavagem remove fisicamente os elementos vinculados ao invés de elementos quimicamente ligados.

O tratamento das amostras de cabelo foi feito através de digestão no micro-ondas, e tal como para o solo, esta digestão mostrou ser adequada e eficiente.

Tabela 9 - Concentrações de Zn, Cu, Fe e Ni obtidas na análise das amostras de cabelo.

Amostra	Concentração (µg/g)			
	Zn	Cu	Fe	Ni
2	87	13	55	1,43
4	145	11	10	0,27
6	343	28	10	3,18

LQ - Limite de quantificação (µg/g): Zn - 0,8; Cu - 0,8; Fe - 0,8; Ni - 0,2.

Apesar de terem sido conseguidas apenas três amostras de cabelo, todas as amostras quantificaram para todos os elementos analisados.

Sendo que a amostra 2 pertence a um indivíduo que bebe vinho e as restantes duas

amostras a pessoas que não bebem vinho, pode observar-se pela Tabela 10 que, as duas amostras de pessoas que não bebem apresentam maior concentração de Zn. A amostra da pessoa que bebe vinho apresenta uma maior concentração de Fe em relação às amostras das pessoas que não bebem. O único parâmetro que talvez possa ser relacionado entre as três amostras será a marca de champô, uma vez que os indivíduos 2 e 4 usam a mesma marca de champô enquanto a pessoa 6 usa um champô anticaspa, o que pode contribuir para as elevadas concentrações de Zn no cabelo deste indivíduo.

Comparando as concentrações de Cu, Fe e Zn nas amostras de cabelo com as concentrações obtidas para os mesmos elementos nas amostras de urina observa-se que estas últimas não quantificaram os vários elementos, o que é devido aos LQ que são bastante mais elevados em FAAS (técnica utilizada na análise das amostras de urina) mas também porque, segundo Gil, F. et al. (2011), as concentrações dos elementos no cabelo são superiores do que as concentrações encontradas na urina.

A tabela seguinte mostra gamas de concentração consideradas normais para os elementos analisados no cabelo, sendo estas apresentadas a partir de dados encontrados na literatura.

Tabela 10 - Gamas de concentrações de Cu, Fe, Zn e Ni consideradas normais para o cabelo humano.

Elemento	Concentrações normais (µg/g)		
	Miekeley, N. et al. (1998)	Pozebon, D. et al. (1999)	Rodushkin, I. and Axelsson, M. D. (2000)
Cu	13 - 35	6,0 - 293	0,3 - 293
Fe	6,0 - 15	10 - 900	3 - 900
Zn	125 - 165	53,7 - 327	40 - 327
Ni	< 1,6	0,002 - 4,05	0,002 - 28

Comparando então os resultados obtidos com as gamas de valores consideradas normais, pode ver-se que as concentrações de Cu e Ni situam-se entre as gamas de concentrações encontradas na literatura. O Fe apresenta gamas de concentração consideradas normais alargadas, e as concentrações obtidas situam-se dentro das gamas de

concentrações consideradas por Pozebon, D. et al. (1999) e Rodushkin, I. and Axelsson, M. D. (2000). Em relação ao Zn, as amostras 2 e 4 situam-se dentro das gamas de concentrações normais indicadas na tabela anterior enquanto a concentração para a amostra 6 é um pouco superior aos valores apontados.

A presença destes elementos no cabelo indica que houve absorção e exposição dos indivíduos a estes elementos. Contudo, é necessário ter atenção na interpretação dos resultados obtidos, uma vez que estes podem ser significativamente influenciados por fatores externos, como a idade, sexo, hábitos alimentares, consumo de tabaco, localização geográfica, ocupação profissional, cosméticos utilizados, entre outros (Daniel, C. R. et al., 2004; Schramm, K. W., 2008). Consequentemente, a informação sobre os hábitos alimentares e todos os dados da pessoa em estudo são de extrema importância.

Embora o cabelo seja mais susceptível a contaminação externa, é preferido em relação a pelos de outras partes do corpo porque é menos afetado pela excreção natural, no entanto, pelos de outras zonas do corpo podem ser úteis para distinguir entre contaminação exógena e endógena (Pozebon, D. et al., 1999; Senofonte, O., et al., 2001).

Ao contrário de outras amostras biológicas, como por exemplo a urina, os elementos vestigiais no cabelo refletem a exposição a longo prazo dos indivíduos (Ashraf, W., et al., 1995). Devido às suas muitas vantagens, as amostras de cabelo são largamente utilizadas para avaliar a exposição humana a diversos elementos (Rodrigues, J. L. et al., 2008).

2.6. Unhas

Para eliminar possíveis contaminantes externos das unhas, a técnica de lavagem deve remover apenas a contaminação da superfície externa das amostras sem a extração de metais e sem que deposite metais na amostra. No entanto, e de acordo com Samanta, G. et al. (2004), os procedimentos de lavagem não influenciam as concentrações dos elementos, devido à forte ligação entre estes e os grupos SH na queratina.

A digestão ácida utilizada na digestão das amostras de unhas foi eficaz na destruição da matéria orgânica, resultando uma solução límpida.

Quanto às percentagens de recuperação obtidas para as amostras de unhas analisadas variaram entre 83% e 101% (um pouco mais abaixo do esperado, entre 85% e

125%) e os desvios duplicados das amostras de unhas foram inferiores a 15%.

Tabela 11 - Concentrações de Zn, Cu, Fe e Ni obtidas na análise das amostras de unhas.

Amostra	Concentração (µg/g)			
	Zn	Cu	Fe	Ni
2	116,3	7,5	1397,0	< LQ
3	71,5	4,9	38,3	< LQ
4	99,1	7,6	85,8	< LQ
6	87,2	4,1	37,2	< LQ
9	135,5	6,2	1275,5	< LQ
10	91,0	3,0	100,8	< LQ
13	112,0	4,0	184,6	< LQ
14	137,5	5,0	231,5	< LQ
16	97,9	2,5	3453,9	< LQ
17	106,2	5,2	62,5	< LQ
18	127,7	7,0	1015,6	< LQ
19	160,1	7,0	367,3	< LQ
20	166,2	4,1	449,7	< LQ
21	108,5	4,9	71,5	< LQ
22	103,3	4,0	352,8	< LQ
24	133,8	3,0	161,9	< LQ
25	131,8	6,6	317,3	< LQ
27	90,1	6,3	708,5	< LQ
28	147,7	5,7	120,3	< LQ
29	161,5	5,3	125,8	< LQ
31	143,0	3,2	264,7	< LQ
32	171,1	< LQ	456,6	< LQ
33	108,4	3,2	61,4	< LQ
35	236,6	5,2	349,1	< LQ
36	65,8	< LQ	44,3	< LQ
38	142,8	3,6	289,3	< LQ
39	144,8	4,9	245,6	< LQ
40	145,0	4,4	27,3	< LQ
41	91,4	3,6	61,9	19,1
44	120,9	3,6	23,2	< LQ
46	389,7	5,7	199,4	< LQ

LQ - Limite de quantificação (µg/g): Zn - 1,0; Cu - 1,0; Fe - 1,0; Ni - 5,0.

Como se pode observar pela tabela anterior todas as amostras de unhas quantificam os elementos Zn e Fe, praticamente todas as amostras quantificam Cu mas apenas uma amostra quantifica Ni. A amostra de unhas que quantifica Ni (19,1 µg/g), não quantifica Ni na amostra de urina, pertence a uma pessoa que não bebe vinho e à partida não apresenta nenhuma característica em especial que justifique este valor.

Na Tabela 12 é apresentada a média e a gama de valores das concentrações de Cu, Fe, Zn e Ni obtidas na análise das amostras de unhas.

Tabela 12 - Estatística descritiva das concentrações de Cu, Fe, Zn e Ni nas amostras de unhas obtidas neste estudo.

Elemento	Unhas (µg/g)		
	n	Média	Gama
Cu	29	4,9 ± 1,4	2,5 - 7,6
Fe	31	405,8 ± 665,0	23,2 - 3453,9
Zn	31	133,7 ± 58,7	65,8 - 389,7
Ni	1	19,1	19,1

A análise de unhas é geralmente baseada numa comparação com gamas de concentração consideradas normais, como a que é apresentada na Tabela 13. Verifica-se que para o Cu, as concentrações obtidas são mais baixas que a gama de concentrações. Quanto ao Fe e ao Zn encontram-se dentro das gamas de concentrações consideradas normais, que são gamas bastante alargadas. Em relação ao Ni, a concentração da única amostra que quantifica, situa-se bastante acima da gama de concentrações.

Tabela 13 - Gama de concentrações de Cu, Fe, Zn e Ni consideradas normais nas unhas (adaptado de Rodushkin, I. and Axelsson, M. D. (2000)).

Elementos	Gama de concentrações ($\mu\text{g/g}$)
Cu	9,4 - 81
Fe	14 - 7300
Zn	73 - 3080
Ni	0,14 - 6

A bioacumulação de metais nas unhas é um processo complexo e influenciado por diversos fatores, como os hábitos alimentares, metabolismo individual, atividade ocupacional, produtos de cosmética, idade, sexo, consumo de tabaco, o meio ambiente, etc. (Hussein Were, F. et al., 2008; Rodushkin, I. and Axelsson, M. D., 2000; Slotnick, M. J. and Nriagu, J. O., 2006). É assim difícil estabelecer valores de referência para os elementos, pois os fatores acima impõem restrições sobre a interpretação dos resultados. Portanto, a inclusão de informações pessoais é importante e pode ajudar a perceber a contribuição de várias vias de exposição.

Na recolha das unhas pôde ver-se que as amostras tinham bastante sujidade e os procedimentos de lavagem efetuados podem não ter sido totalmente eficazes na remoção da sujidade. Logo, a presença de metais nas amostras de unhas analisadas pode também dever-se a contaminação externa, uma vez que grande parte das pessoas envolvidas no estudo são agricultoras ou cultivam produtos hortícolas, o que faz com que tenham um grande contacto com o solo.

Embora tanto as unhas das mãos como as dos pés possam ser utilizadas, alguns autores consideram que a análise das unhas dos pés é melhor do que as unhas das mãos porque as unhas dos pés são menos expostas à contaminação externa e têm uma taxa de crescimento mais lenta do que as unhas das mãos e, portanto, podem proporcionar uma maior integração da exposição (Adair, B. M. et al., 2006; Esteban, M. and Castano, A., 2009). Outros autores preferem as unhas das mãos porque estas não estão tão sujeitas a infeções fúngicas e a outro tipo de infeções.

Batista, B. L. et al. (2008) afirma que as unhas são menos afetadas pela contaminação ambiental exógena do que o cabelo, e por isso estas são preferidas para

determinar a exposição a metais.

2.7. Relações entre as variáveis estudadas

Como visto anteriormente, as amostras de cabelo são apenas três e apesar de quantificarem para todos os elementos, é um número demasiado reduzido para utilizar esta matriz na realização de análises estatísticas entre variáveis. Quanto à urina, como esta amostra quantificou concentrações de Zn apenas para algumas amostras, também não será uma matriz indicada para fazer análises estatísticas. Assim, a melhor matriz biológica para correlacionar as várias variáveis será as unhas.

▪ Correlação entre o pH e as concentrações dos elementos no solo

A Tabela 14 apresenta os coeficientes de correlação entre o pH obtido para os solos analisados e as concentrações dos vários elementos nos solos a diferentes profundidades. Para o Zn não são indicados os valores de correlação, uma vez que só havia duas amostras que quantificavam este elemento.

Tabela 14 - Coeficientes de correlação de Spearman entre o pH do solo à superfície (pH solo 0 cm) e em profundidade (pH solo 40 cm) e as concentrações de Cu, Fe e Ni no solo.

Elemento	pH solo 0 cm	pH solo 40 cm
Cu	-0,715* (n=8)	-0,138 (n=10)
Fe	0,432 (n=21)	0,466* (n=21)
Ni	0,611** (n=17)	0,828** (n=19)

*A correlação é estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

** A correlação é estatisticamente significativa ($p < 0,01$).

Neste caso, pode constatar-se que existe uma correlação negativa forte entre o pH à superfície e as concentrações do Cu nesta camada de solo. Verifica-se também que existe uma correlação positiva entre o pH em profundidade e as concentrações de Fe. Quanto ao elemento Ni, existem correlações fortemente positivas entre o pH e as concentrações deste

elemento em ambas as camadas de solo analisadas, ou seja, à medida que o pH aumenta as concentrações de Ni também aumentam.

Gastalho, C. et al. (2009) indica que, com o aumento do pH, a presença dos micronutrientes Cu e Zn diminui no solo, o que de acordo com os resultados obtidos se verifica para o Cu. Como verificado anteriormente, o solo da região é muito rico em Fe e como tal, a presença excessiva de íons metálicos, como Fe, pode reduzir a disponibilidade de Cu para as plantas. Os resultados do estudo de Rodrigues, S. M. et al. (2010) explicam o aumento das concentrações de Fe e Ni com o aumento do pH, dizendo que em solos onde a gama de pH está entre 3 e 7 ocorrem processos de competição catiónica, motivo pelo qual os cátions presentes na fase sólida do solo se irão encontrar mais disponíveis para serem absorvidos pelas plantas.

▪ **Correlação entre as concentrações de Cu, Fe, Zn e Ni no solo, vinho, urina, cabelo e unhas**

A análise estatística através de correlações é feita de modo a encontrar possíveis relações entre as concentrações dos vários elementos analisados nas várias matrizes. Para demonstrar estatisticamente as possíveis correlações foi utilizado o teste de Spearman.

Como visto anteriormente, as amostras de cabelo são poucas e como tal não é possível fazer correlações utilizando esta matriz. Para o Cu e para o Zn não foram indicados os coeficientes de correlação, uma vez que também não havia amostras suficientes que quantificassem estes elementos.

As matrizes de correlação apresentadas nas Tabelas 15 e 16 indicam o grau de correlação entre as concentrações dos vários elementos nas diferentes matrizes e se essas correlações são estatisticamente significativas.

Tabela 15 - Coeficientes de correlação de Spearman entre as concentrações de Fe nas amostras de solo, vinho e unhas.

	Fe solo (0 cm)	Fe solo (40 cm)	Fe vinho	Fe unhas
Fe solo (0 cm)	1,000	0,627** (n=21)	-0,079 (n=21)	0,244 (n=16)
Fe solo (40 cm)	0,627** (n=21)	1,000	-0,495* (n=21)	-0,118 (n=16)
Fe vinho	-0,079 (n=21)	-0,495* (n=21)	1,000	0,511* (n=16)
Fe unhas	0,244 (n=16)	-0,118 (n=16)	0,511* (n=16)	1,000

*A correlação é estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

** A correlação é estatisticamente significativa ($p < 0,01$).

Por análise da tabela anterior pode observar-se que existem algumas correlações entre o elemento Fe e as matrizes analisadas. Há correlação positiva entre as concentrações de Fe no solo a 0 cm e a 40 cm. As concentrações deste elemento estão correlacionadas negativamente nas amostras de solo a 40 cm e nas amostras de vinho. E verifica-se também uma correlação positiva entre as concentrações de Fe no vinho e as concentrações de Fe nas unhas.

Tabela 16 - Coeficientes de correlação de Spearman entre as concentrações de Ni nas amostras de solo.

	Ni solo (0 cm)	Ni solo (40 cm)
Ni solo (0 cm)	1,000	0,908** (n=16)
Ni solo (40 cm)	0,908** (n=16)	1,000

** A correlação é estatisticamente significativa ($p < 0,01$).

Em relação ao elemento Ni e por análise da Tabela 16, verifica-se que este elemento apresenta uma correlação fortemente positiva entre as concentrações no solo à superfície e as concentrações deste elemento em profundidade. Não foram feitas correlações entre as matrizes vinho e unhas, porque poucas foram as amostras analisadas que quantificaram Ni.

Os gráficos de dispersão são uma ferramenta que ajuda a encontrar uma relação entre duas variáveis. Assim, por observação das Figuras 2, 3, 4 e 5 podem confirmar-se as correlações significativas entre as variáveis observadas para os testes de Spearman (Tabelas

15 e 16).

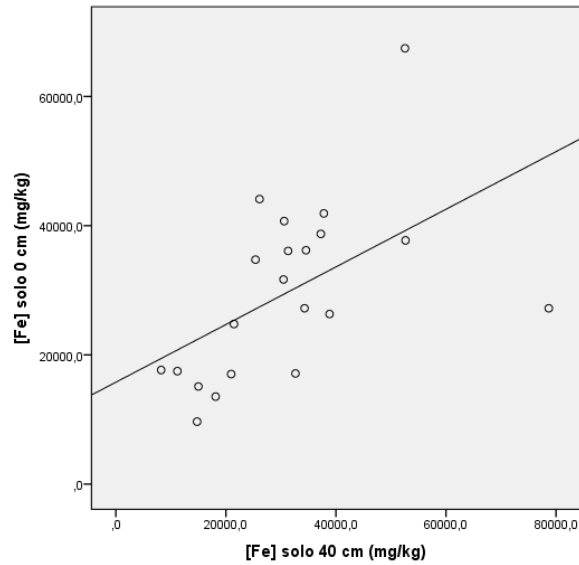


Figura 2 - Gráfico de dispersão que mostra a relação entre as concentrações de Fe (mg/kg) no solo à superfície (solo 0 cm) e em profundidade (40 cm).

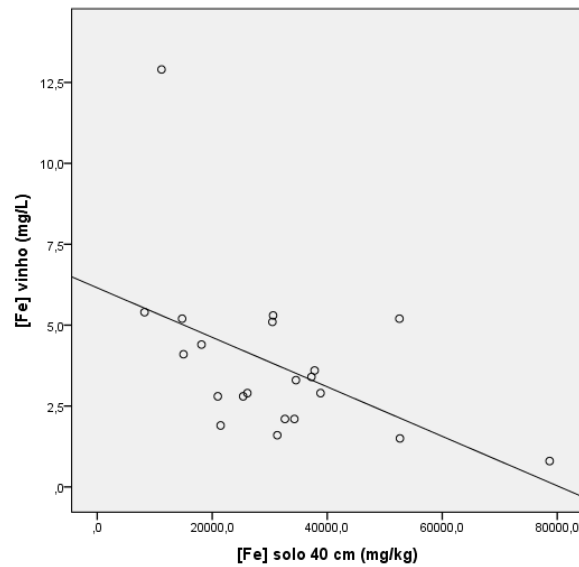


Figura 3 - Gráfico de dispersão que mostra a relação entre as concentrações de Fe (mg/L) nos vinhos e as concentrações de Fe (mg/kg) nos solos em profundidade (solo 40 cm).

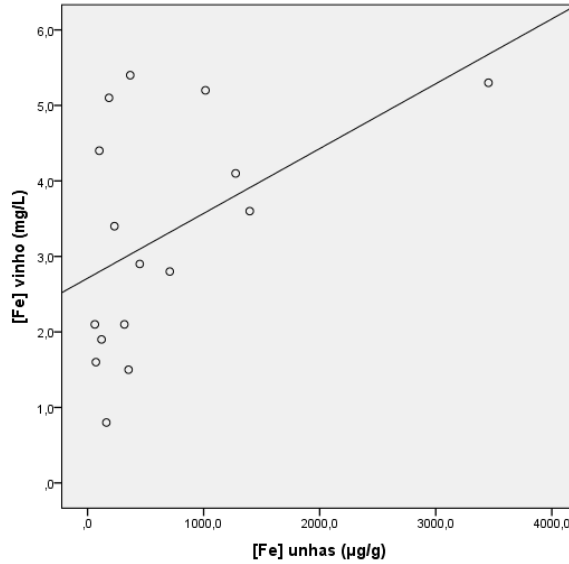


Figura 4 - Gráfico de dispersão que mostra a relação entre as concentrações de Fe (mg/L) no vinho e as concentrações de Fe ($\mu\text{g/g}$) nas unhas.

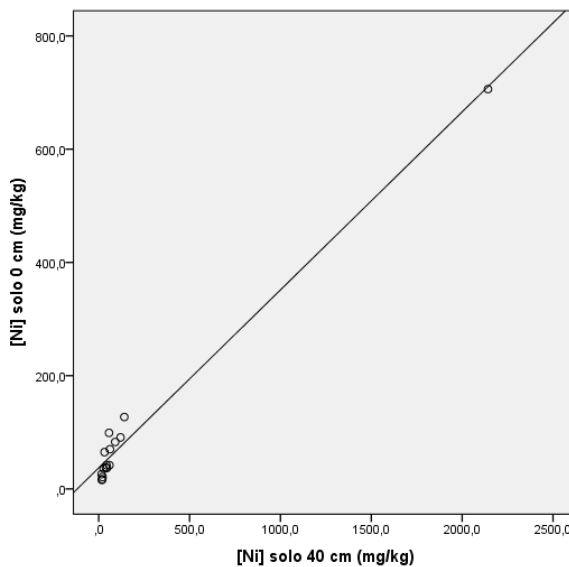


Figura 5 - Gráfico de dispersão que mostra a relação entre as concentrações de Ni (mg/kg) no solo à superfície (0 cm) e em profundidade (40 cm).

Justificando os resultados acima obtidos, pode dizer-se que era esperada uma relação positiva entre as duas camadas de solo para os elementos Fe e Ni, e isto pode dever-se à riqueza dos solos da região nestes dois elementos. Quanto à relação negativa

estabelecida entre o solo em profundidade e o vinho para o elemento Fe, pode justificar-se da seguinte forma: é aproximadamente a 40 cm que as raízes das videiras começam, e portanto é nesta camada de solo que a videira vai buscar os seus nutrientes. Sabe-se que as plantas se comportam tanto como mecanismo de transferência dos elementos do solo para níveis mais elevados da cadeia trófica, mas também como uma importante barreira nessa transferência. Assim, a videira pode reter as elevadas concentrações de Fe que absorve do solo e não as transfere para as uvas e, por sua vez, para o vinho. Uma outra justificação é que o processo de vinificação pode alterar consideravelmente o conteúdo mineral do vinho, uma vez que, no decorrer da fermentação, a concentração de elementos como o Fe podem diminuir, por precipitação, e por absorção e adsorção por leveduras e bactérias (Catarino, S. et al., 2008; Suhaj, M. and Koreňovská, M., 2005). Durante o armazenamento do vinho, a concentração de metais também pode diminuir (Grindlay, G. et al., 2009).

Os elementos endógenos presentes no vinho são de origem natural e refletem a geoquímica do solo onde as videiras crescem, providenciando a maior parte dos iões presentes no vinho e também a capacidade das videiras assumirem as substâncias minerais (Fabani, M. P. et al., 2010; Kment, P. et al., 2005; Pohl, P., 2007). No entanto, os elementos presentes no vinho também podem ter origem exógena, surgindo de fontes antropogénicas e são associados com a contaminação externa durante o crescimento da videira (originada da fertilização e utilização de pesticidas) ou durante as diferentes etapas da produção de vinho (equipamentos utilizado durante o processamento, conservação e engarrafamento) (Fabani, M. P. et al., 2010; Pohl, P., 2007; Stafilov, T. and Karadjova, I., 2009).

O solo desempenha como principal função ser a fonte de nutrientes para as plantas e, como tal, pode passar os elementos presentes no solo para as videiras e por sua vez, para o vinho. A absorção de elementos a partir da vinha depende da sua acumulação, transporte e solubilidade desses elementos que dependem fortemente das características do solo, como o pH (Alvarez, M. A. and Carrillo, G., 2012; Pohl, P., 2007).

Pode também verificar-se uma relação positiva entre as concentrações de Fe no vinho e nas unhas, ou seja, quando aumenta a concentração de Fe no vinho também aumenta a concentração de Fe nas unhas. Isto é, quando as pessoas ingerem vinhos com maiores concentrações em Fe, estas vão apresentar maiores concentrações de Fe nas unhas.

▪ **Há diferenças nas concentrações de Cu, Fe, Zn e Ni entre as pessoas que bebem vinho e que não bebem vinho?**

Para avaliar se há diferenças estatisticamente significativas nas concentrações de Cu, Fe, Zn e Ni entre as pessoas que bebem e que não bebem vinho foram feitas análises estatísticas utilizando o teste de Mann-Whitney.

A hipótese a testar é se existem diferenças nas concentrações de Cu, Fe, Zn e Ni nas matrizes biológicas (urina, cabelo e unhas) entre as pessoas que bebem e que não bebem vinho.

Para as amostras de urina só se pôde realizar os testes estatísticos para o elemento Zn, uma vez que foi o único elemento que quantificou. Para este elemento nesta matriz não se verificaram diferenças estatisticamente significativas nas concentrações entre as pessoas que bebem e que não bebem vinho, ou seja, beber vinho não influencia as concentrações de Zn na urina.

Em relação ao cabelo, observou-se que não existem diferenças estatisticamente significativas nas concentrações de Cu, Fe, Zn e Ni de quem bebe e de quem não bebe vinho, embora sejam poucas as amostras analisadas.

Quanto às unhas, como já dito o elemento Ni não foi analisado nesta matriz, por isso quanto a este nada se pode dizer. Para o Cu e para o Zn, os testes estatísticos mostram que não há diferenças estatisticamente significativas nas concentrações entre as pessoas que bebem e que não bebem vinho. Constatou-se que existem diferenças estatisticamente significativas ($U=52$, $p=0,006$) entre as concentrações de Fe nas unhas das pessoas que bebem vinho ($n=16$) e das pessoas que não bebem ($n=15$).

Nas Figuras 6, 7 e 8 são representados boxplots, que relacionam as concentrações dos elementos (Zn, Cu e Fe) que quantificaram para as amostras de unhas, de maneira a comparar os resultados obtidos entre as pessoas que bebem vinho e as pessoas que não bebem vinho.

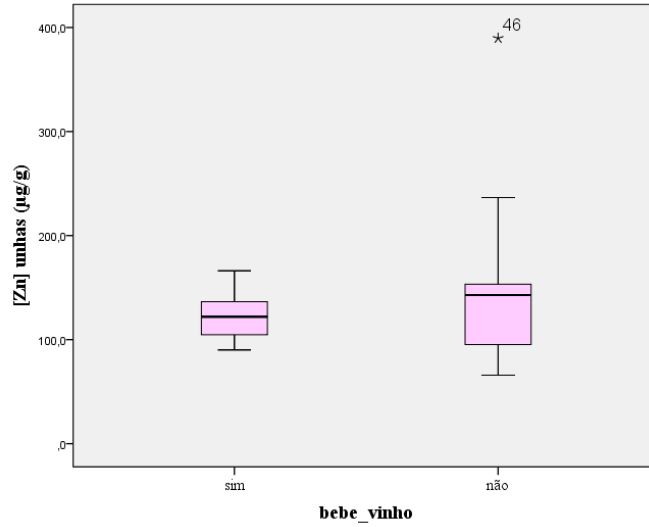


Figura 6 - Boxplots referentes às concentrações de Zn ($\mu\text{g/g}$) nas unhas das pessoas que bebem vinho e que não bebem vinho.

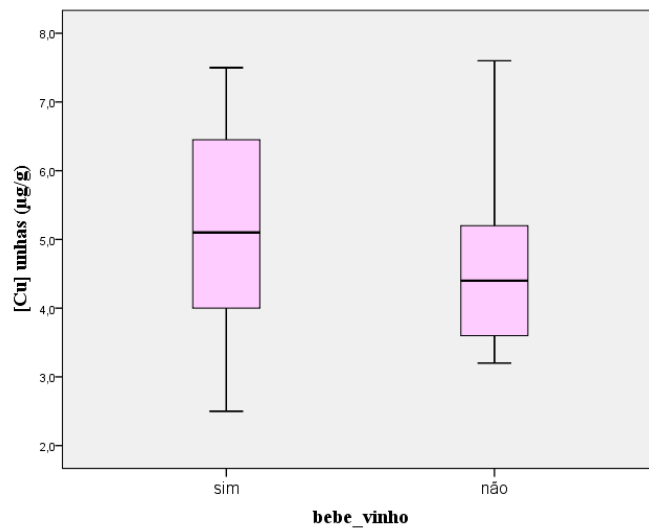


Figura 7 - Boxplots referentes às concentrações de Cu ($\mu\text{g/g}$) nas unhas das pessoas que bebem vinho e que não bebem vinho.

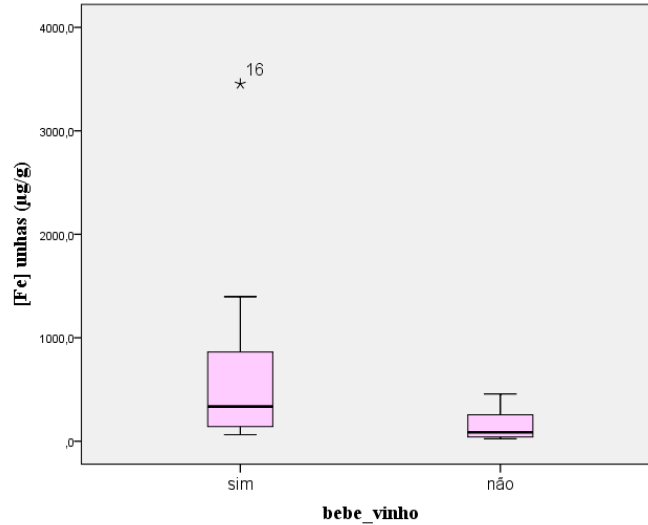


Figura 8 - Boxplots referentes às concentrações de Fe ($\mu\text{g/g}$) nas unhas das pessoas que bebem vinho e que não bebem vinho.

Verifica-se que as pessoas que não bebem vinho apresentam maior quantidade de Zn nas unhas (concentração média $145,3 \mu\text{g/g}$) do que as pessoas que bebem vinho (concentração média de $122,9 \mu\text{g/g}$). Em relação ao elemento Cu passa-se o oposto, ou seja, as pessoas que bebem vinho apresentam maior concentração deste elemento nas unhas (concentração média de $5,1 \mu\text{g/g}$) enquanto as pessoas que não bebem vinho apresentam concentrações mais baixas (concentração média de $4,7 \mu\text{g/g}$). Quanto ao Fe acontece o mesmo que para o elemento Cu, sendo que as unhas das pessoas que bebem vinho apresentam uma concentração média de $641,9 \mu\text{g/g}$ e as unhas das pessoas que não bebem vinho apresentam uma concentração média de $154,0 \mu\text{g/g}$ de Fe.

Por observação das Figuras 6 e 8, pode ver-se que existem dois outliers, ou seja, valores extremos que estão muito descentrados. Para o Zn é a amostra 46 e para o Fe é a amostra 16. Pelos dados obtidos nos questionários, a única característica em relação ao indivíduo 16 que possa ser diferente dos outros indivíduos deste estudo é que esta pessoa tem depressão e toma medicamentos para a doença, o que talvez possa influenciar as concentrações de Fe nas unhas. Quanto ao indivíduo 46, este não apresenta nenhuma característica, pelo menos em relação aos fatores avaliados no questionário, que possa contribuir para que este apresente tão elevada concentração de Zn nas unhas em relação aos outros indivíduos deste estudo.

Assim, através da análise estatística realizada anteriormente pode concluir-se que beber vinho influencia a concentração de Fe nas unhas, sendo que as pessoas que bebem vinho apresentam maior concentração de Fe nesta matriz. Pode também concluir-se que a variável “beber vinho” não influencia a concentração de Fe no cabelo e na urina, isto porque provavelmente os elementos vestigiais absorvidos são distribuídos de forma heterogénea entre os órgãos e tecidos, o que pode causar discrepâncias entre as concentrações dos elementos na urina, cabelo e unhas de um indivíduo numa dieta normal (Munakata, M. et al., 2006).

Voica, C. et al. (2009) afirma que o consumo moderado de vinho contribui para o aumento da ingestão diária de metais, incluindo Cu, Fe, Ni e Zn. Frimpong, N. A. and Louis-Charles, J. (1989) indicam que o consumo moderado de álcool aumenta as concentrações de Zn e Cu no organismo, todavia Schuhmacher, M. et al. (1994) não encontrou diferenças entre os níveis de Cu e Fe na urina de pessoas que bebem e de pessoas que não bebem vinho. Não foram encontrados estudos que mostrem se há ou não diferenças entre as concentrações de Cu, Fe, Zn e Ni em cabelo ou nas unhas.

▪ **Estudo de outras possíveis relações entre as variáveis**

Testou-se a hipótese se havia diferenças significativas nas concentrações de Cu, Fe, Zn, Ni entre homens e mulheres e constatou-se que não existem diferenças estatisticamente significativas nas concentrações dos vários elementos entre os dois sexos. No entanto, as concentrações de Fe nas unhas dos homens (n=13, média=474,8 µg/g) são mais elevadas do que nas unhas das mulheres (n=18, média=356,0 µg/g) e o mesmo se verifica nas concentrações de Cu, sendo que os homens (n=12, média=5,3 µg/g) apresentam maior concentração deste elemento nas unhas do que as mulheres (n=17, média=4,6 µg/g). Em sentido contrário, as concentrações de Zn nas unhas das mulheres (n=18, média=143,0 µg/g) são mais elevadas do que nas unhas dos homens (n=13, média=120,8 µg/g).

Uma outra hipótese testada é se haveria diferenças nas concentrações de Cu, Fe, Zn, Ni entre homens e mulheres que bebem vinho. Os resultados obtidos indicaram que não existem diferenças estatisticamente significativas, o que pode dever-se ao facto do estudo comportar um número reduzido de mulheres que bebem vinho.

Pelos testes estatísticos realizados verifica-se que não existem diferenças estatisticamente significativas nas concentrações dos vários elementos nas matrizes urina, cabelo e unhas entre as pessoas que tem ou não doenças, ou seja, ter ou não doenças não influencia as concentrações de Cu, Fe e Zn nas várias matrizes. Para o Ni não foi possível realizar esta análise estatística.

Compararam-se as médias das concentrações de Cu, Fe, Zn, Ni entre as pessoas que tomam e que não tomam medicamentos. As concentrações médias de Cu nas unhas das pessoas que não tomam medicamentos (n=8, média=5,2 µg/g) são superiores às encontradas nas unhas das pessoas que tomam medicamentos (n=21, média=4,8 µg/g) enquanto as concentrações médias de Fe nas unhas das pessoas que tomam medicamentos (n=22, média=512,8 µg/g) são superiores às encontradas nas unhas das pessoas que não tomam medicamentos (n=9, média=144,3 µg/g). No mesmo sentido, verifica-se que as concentrações médias de Zn nas unhas das pessoas que tomam medicamentos (n=22, média=143,1 µg/g) são superiores às encontradas nas unhas das pessoas que não tomam medicamentos (n=9, média=110,6 µg/g). No entanto, constataram-se que não existem diferenças estatisticamente significativas nas concentrações dos vários elementos entre as pessoas que tomam e que não tomam medicamentos.

Uma das hipóteses testadas é se haveria diferenças nas concentrações dos vários elementos analisados nas unhas entre quem pinta e quem não pinta as mesmas. Não se testou para o Ni porque não havia amostras suficientes que quantificassem este elemento. Pelos testes estatísticos constata-se que as pessoas que não pintam as unhas (n=28, média=444,5 µg/g) apresentam maior concentração de Fe nas unhas do que as pessoas que pintam as unhas (n=3, média=45,3 µg/g), sendo essas diferenças estatisticamente significativas (U=76, p=0,018). O mesmo não se verifica para os restantes elementos. Contudo, estes resultados devem ser interpretados com alguma prudência, visto que existe uma grande discrepância entre o número de sujeitos que pinta e que não pinta as unhas.

Pelos testes estatísticos realizados, verifica-se também que existem diferenças estatisticamente significativas (U=8,625, p=0,035) nas concentrações de Fe nas unhas entre as pessoas que bebem vinho com maior ou menor frequência. Assim, as pessoas que não bebem vinho apresentam uma concentração média de 154,0 µg/g de Fe nas unhas (n=15). Foi apenas encontrada uma pessoa que bebe vinho uma vez por semana, e esta apresenta

uma concentração de 100,8 $\mu\text{g/g}$ de Fe nas unhas. As pessoas que bebem vinho uma vez por dia ($n=4$) possuem uma concentração média de Fe de 404,1 $\mu\text{g/g}$ nas unhas e as pessoas que bebem vinho duas ou mais vezes por dia ($n=11$) apresentam uma concentração média de Fe de 777,6 $\mu\text{g/g}$. Pode assim dizer-se que as pessoas que bebem vinho com maior frequência apresentam maior concentração de Fe nas unhas.

Para a hipótese de haver diferenças nas concentrações de Cu, Fe, Zn e Ni no solo com os diferentes tratamentos feitos às vinhas (lavragem, estrumagem, adubagem, pesticidas) observa-se que não existem diferenças estatisticamente significativas nas concentrações dos vários elementos para os tratamentos lavragem e estrumagem. Para o tratamento adubagem ($n=15$) verifica-se que existem diferenças estatisticamente significativas nas concentrações de Ni no solo a 40 cm de profundidade ($U=53$, $p=0,020$). Em relação ao tratamento com pesticidas ($n=15$), como a calda bordalesa e enxofre, constata-se que também existem diferenças estatisticamente significativas nas concentrações de Ni no solo à superfície ($U=19$, $p=0,029$). Ou seja, a adubagem e a aplicação de pesticidas nas vinhas influencia as concentrações de Ni nos solos e isto pode ser justificado, uma vez que a maior parte dos adubos e dos pesticidas são ricos neste elemento. Para os restantes elementos não se verificaram diferenças estatisticamente significativas.

Para a hipótese testada de que há diferenças nas concentrações de Cu, Fe, Zn e Ni no vinho com os diferentes tratamentos feitos às vinhas, constatou-se que não existem diferenças estatisticamente significativas. Assim, os tratamentos efetuados às vinhas não influenciam as concentrações dos vários metais nos vinhos.

Por último, verificou-se também que as diferentes proveniências da água consumida (água da torneira, água da fonte, água engarrafada) não influenciavam as concentrações de Cu, Fe e Zn na urina, cabelo e unhas, uma vez que não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre estas variáveis. O Ni não pode ser utilizado para analisar essas diferenças devido ao número reduzido de amostras que quantificaram. Para os elementos Cu e Zn as concentrações médias mais elevadas foram observadas nas unhas de pessoas que ingeriam água engarrafada ($n=11$), tendo como valores obtidos, para o Cu 5,6 $\mu\text{g/g}$ e para o Zn 170,2 $\mu\text{g/g}$. As maiores concentrações médias de Fe (542,4 $\mu\text{g/g}$) foram obtidas nas unhas de pessoas que consumiam água da fonte ($n=6$), o que pode ser

justificado pelo facto de que os solos da região são ricos em Fe e assim as águas das fontes também poderão ser ricas neste elemento. Com o consumo de águas ricas em Fe, este poderá acumular-se nas unhas do ser humano.

2.8. Principais problemas e limitações no estudo

Ao longo deste trabalho surgiram algumas dificuldades e limitações que eventualmente terão prejudicado os resultados obtidos.

Neste estudo, a sonda de temperatura do micro-ondas, utilizado na digestão das amostras de solo e cabelo estava danificada e como tal, não se pode aplicar um programa de temperaturas, o que poderia ter tornado as digestões ainda mais eficientes.

Vale salientar que erros sistemáticos são normalmente feitos durante a preparação das amostras, de modo que a técnica analítica não pode ser responsabilizada. Muitas vezes, os procedimentos de digestão, a contaminação das amostras, quer através de reagentes ou do material utilizado, erros manuais, perda de analito através de volatilização, a incompleta recuperação do analito ou interferências podem adicionar incerteza analítica.

Na determinação das concentrações de metais, todo o material que entra em contacto com as amostras pode ser uma fonte de interferência, interferência positiva por desorção das suas paredes ou interferência negativa por adsorção dos metais presentes na amostra (EPA, 2004). A adequada preparação do material de amostragem e de armazenamento bem como a adequada conservação das amostras é fundamental para evitar este tipo de contaminação (EPA, 2004). Por isso, todos os reagentes bem como todos os padrões utilizados deveriam ser também analisados, de forma a excluir a possibilidade de contaminação das amostras por estes.

A falta de procedimentos padrão para recolha, lavagem e tratamento de amostras, têm levado a uma grande controvérsia em relação à confiabilidade dos resultados da análise de amostras de cabelo e de unhas. A contaminação externa complica também a interpretação dos resultados da análise destas matrizes, tornando-se difícil determinar os níveis endógenos dos elementos no cabelo e nas unhas.

Uma enorme limitação neste trabalho foram os LQ para os métodos utilizados, uma vez que são limites demasiado altos para conseguir quantificar Ni nas amostras de unhas

por ICP-AES e quantificar Fe, Cu e Zn nas amostras de urina por FAAS. Assim, uma grande parte das amostras não quantificou os elementos analisados, o que fez com que os resultados deste estudo sejam escassos.

Outra dificuldade neste estudo foi encontrar valores de referência recentes para as concentrações dos elementos Cu, Fe, Zn e Ni, com que se possam comparar os resultados obtidos neste estudo nas várias matrizes analisadas.

O trabalho a desenvolver encontrava-se à partida limitado ao estudo de quatro elementos, Cu, Fe, Zn e Ni, nas matrizes solo, vinho, cabelo, unhas e urina. No entanto, devido a dificuldades de disponibilidade do equipamento, custos de análise e tempo, não foi possível determinar Ni nas amostras de urina, sendo este um grande ponto fraco, um vez que assim não se pode fazer a correlação entre o solo, o vinho e as matrizes biológicas para este elemento, utilizando esta matriz, o que seria uma mais-valia para este trabalho.

Assim, visto que foram conseguidas poucas amostras de cabelo, apenas um número reduzido de amostras de urina quantificou os vários elementos analisados e também devido ao pequeno número total de amostras conseguidas, os resultados deste estudo deverão ser analisados com alguma precaução, tendo em conta as limitações anteriormente referidas.

CAPÍTULO 3 - CONCLUSÃO

A influência da composição química do solo na qualidade do vinho está ainda por descobrir ainda que, segundo inúmeros estudos sugeriram que os metais parecem ser a melhor forma de identificar a origem geográfica de um vinho devido à sua relação direta com a composição do solo. Assim, a concentração de alguns elementos pode funcionar como uma espécie de impressão digital do vinho.

Pode concluir-se através deste estudo que o Fe é o elemento que melhor estabelece correlações entre as matrizes solo/vinho/ser humano. Fabani, M. P. et al. (2010) e Kment, P. et al. (2005) indicam que o elemento Fe é um possível marcador em estudos da origem da proveniência dos vinhos em países europeus. Assim, este elemento pode ser utilizado para estabelecer uma correlação entre a presença de Fe em diferentes camadas de solo, entre o solo e o vinho e também entre o vinho e as unhas, sendo possível distinguir entre quem bebe e quem não bebe vinho através das concentrações deste elemento. No entanto esta conclusão não pode ser generalizada, uma vez que o tamanho da amostra do presente estudo não é significativa.

Quanto ao Ni, verifica-se apenas que existe uma relação entre as concentrações deste elemento em ambas as camadas de solo, não havendo relação entre o solo e o vinho, e entre este e o ser humano.

Nada se pode concluir em relação aos elementos Cu e Zn nas diversas matrizes analisadas. O cabelo e a urina são matrizes que neste estudo não permitem a sua análise estatística e por isso quanto a estas também nada se pode dizer, constatando-se que as unhas proporcionam um bom indicador da exposição aos elementos vestigiais analisados.

Da literatura, o resultado esperado é que o vinho refletisse a geoquímica do solo, uma vez que todos os elementos estudados resultam, em maior ou menor extensão, da natureza deste (Fiket, Ž. et al., 2011). No entanto, vários fatores podem alterar significativamente a composição multi-elementar do vinho e pôr em risco a relação entre o vinho e a composição do solo. O uso de pesticidas, os processos de elaboração e todos os equipamentos utilizados na produção de vinho, são outra fonte importante da presença de metais (Álvarez, M. et al., 2012; Fabani, M. P. et al., 2010; Lara, R. et al., 2005). Por sua vez, diversos fatores influenciam também a absorção e acumulação de elementos vestigiais no organismo humano.

Para desenvolvimento futuro deste trabalho, poderá ser interessante analisar os

metais nas uvas, o que será uma mais-valia para perceber a relação solo/vinho, bem como para compreender se os elementos que estão presentes no vinho, provêm do solo ou se surgem de contaminações ocorridas durante o processo de produção. A análise de outros elementos poderá também trazer informações importantes. Por exemplo, o estudo de isótopos de Sr, cuja composição isotópica varia naturalmente com a região geográfica, pode ser um possível marcador da origem geográfica do vinho e também no ser humano, um marcador do consumo de vinho.

A crescente preocupação com a segurança alimentar do vinho e os efeitos na saúde têm vindo a aumentar. Por esta razão será importante ajustar os limites máximos admissíveis de metais no vinho na legislação nacional, tendo em conta as concentrações dos elementos no solo em Portugal. A legislação deve ainda considerar um maior número de elementos cujas concentrações tem de ser monitorizadas, no solo e também no vinho.

CAPÍTULO 4 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O trabalho prático deste projeto decorreu nos laboratórios da AEMITEQ e foram utilizados os equipamentos e meios disponíveis nestas instalações. Algumas das soluções utilizadas neste trabalho laboratorial foram cedidas pelo Departamento de Química.

Neste capítulo são descritos os materiais, reagentes e equipamentos utilizados neste trabalho. Também é descrita toda a metodologia, desde a recolha das amostras até à sua análise.

Todo o material utilizado na realização deste trabalho laboratorial foi devidamente lavado, no mínimo três vezes, com água bi-desionizada. Em seguida, deixou-se o material a lixiviar durante 24 horas numa solução de HNO_3 50%. Retirou-se o material do ácido, lavou-se muito bem com água bi-desionizada e, por fim, deixou-se a secar na estufa.

4.1. Materiais

- Sacos de plástico transparentes para recolha de solo;
- Sacos de plástico transparentes com fecho zip para recolha de cabelo;
- Recipientes de polipropileno com capacidade de 1 L para recolha de vinho;
- Recipientes de polipropileno com capacidade de 50 ml para recolha de urina;
- Excisador com agente secante, sílica;
- Cápsulas de porcelana, capazes de permanecer a 105°C ;
- Filtros de papel, de 90 mm, equivalentes aos filtros de papel da Whatman de 40 mm de diâmetro e 7-14 μm de porosidade;
- Material volumétrico e graduado para medição rigorosa de volumes.

4.2. Reagentes

- Água ultrapura produzida no sistema Millipore, condutividade $18,2 \mu\text{S}/\text{cm}$;
- Soluções tampão para a determinação de pH:

- Solução tampão 4,0 (citrato), Radiometer analytical;
- Solução tampão 7,0 (fosfato), Radiometer analytical;
- Solução tampão 10,0 (carbonato), Radiometer analytical;
- Solução tampão $7,413 \pm 0,010$, Radiometer analytical.
- Peróxido de hidrogénio, H_2O_2 , Panreac, 30% (w/v) (100 vol.);
- Ácido nítrico, HNO_3 , 65%, Panreac, $d=1,39$;
- Ácido perclórico, $HClO_4$, 60%, Panreac;
- Triton X-100, Merck;
- Acetona, C_3H_6O , José Manuel Gomes dos Santos LDA, 99,6%;
- Solução padrão multi-elemento XIII ICP da Certipur (101 mg/L de Cobre; 100 mg/L de Ferro; 102 mg/L de Níquel; 102 mg/L de Zinco);
- Solução mãe de Cobre 1000 $\mu g/L$, Merck;
- Solução mãe de Ferro 998 $\mu g/L$, Merck;
- Solução mãe de Zinco 1000 mg/L, VHG;
- Solução mãe de Níquel 1002 mg/L, Merck;
- Árgon de elevada pureza, 99,999%;
- Acetileno dissolvido.

4.3. Equipamentos

- Balança analítica, Marca: Kern, Modelo: 770, que garanta a precisão de, pelo menos, 0,1 mg;
- Micro-ondas, Marca: Milestone, Modelo: 1200 mega;

- Medidor de pH, Marca: Radiometer, Modelo: 371-12-009;
- Espectrómetro de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado, Marca: Unicam, Modelo: 701;
- Computador, no qual está instalado o *software* 701 ICP Systems que controla o ICP;
- Espectrómetro de Absorção Atômica, Marca: Unicam, Modelo: M Series;
- Computador, no qual está instalado o *software* Solaar que controla a câmara de grafite e o espectrómetro;
- Câmara de grafite, que opera com cuvetes de grafite do tipo ELC (Extended Life Cuvete) acoplado ao injetor automático modelo FS 95, Marca: Unicam;
- Espectrómetro de Absorção Atômica, Marca: Unicam, Modelo: 939;
- Computador, no qual está instalado o *software* Solaar que controla a chama e o espectrómetro;
- Lâmpada de cátodo oco de Cobre, Ferro, Zinco e Níquel;
- Lâmpada de deutério, Marca: Unicam.

4.4. Amostragem

Neste estudo foram recolhidas amostras de solo, vinho, urina, cabelo e unhas de pessoas que consumiam vinho frequentemente (vinho produzido pelos próprios e de forma caseira), e foram recolhidas amostras de urina, cabelo e unhas de pessoas que não consumiam vinho, fazendo estas pessoas parte do grupo controlo. Os locais de recolha das amostras foram a cidade de Macedo de Cavaleiros e as aldeias de Grijó, Morais e Sobreda.

No momento da recolha foi preenchido um questionário por todas as pessoas que cederam as amostras. No questionário eram pedidos dados pessoais como idade, sexo, doenças, e questões sobre os hábitos pessoais e alimentares como a profissão, medicação, consumo de vinho, entre outras questões. Este questionário encontra-se no Anexo I.

Cada amostra e cada questionário receberam o mesmo código. Depois da recolha de todas as amostras, estas foram transportadas para o laboratório devidamente acondicionadas.

a) Recolha de solo: Por cada pessoa que bebia o próprio vinho, ou seja, vinho produzido pelas uvas das próprias vinhas, foram recolhidas duas amostras de solo dessas vinhas, com peso aproximado de 1 kg cada uma das amostras. Uma amostra de solo foi recolhida à superfície (0 cm) e outra amostra foi recolhida a cerca de 40 cm de profundidade, uma vez que as raízes das videiras começam, mais ou menos, a esta profundidade. Foi utilizada uma pá para escavar o solo, sendo rejeitado o solo que esteve em contacto com a pá. Um total de quarenta e duas amostras de solo foram recolhidas, correspondentes a solos de vinte e uma pessoas que bebem vinho.

Os locais de amostragem foram selecionados de modo a evitar qualquer distúrbio antropogénico do solo. A camada orgânica (a camada fina de vegetação) foi previamente removida e evitou-se a recolha de solo em locais encharcados, próximos de caminhos, ocupados com montes de estrume, adubos, cinzas ou outros produtos.

As amostras de solo foram guardadas separadamente em sacos de plástico, devidamente etiquetados. Foram transportadas para o laboratório e guardadas em local seco e fresco. Os sacos foram mantidos fechados, de modo a conservar a humidade dos solos.

b) Recolha de vinho: Cada pessoa cedeu uma amostra de vinho produzido pelo próprio, num total de vinte e uma amostras de vinho. Todos os vinhos recolhidos foram vinhos tintos, uma vez que a maioria das pessoas da região de recolha produz este tipo de vinho. As amostras de vinho foram recolhidas para recipientes de polipropileno. Estes foram etiquetados e armazenados em local fresco até à sua análise.

c) Recolha de urina: Foi pedido a cada pessoa que cedesse uma amostra de urina para um recipiente de polipropileno, de preferência a primeira urina da manhã. Os recipientes foram etiquetados, devidamente acondicionados e guardados em local fresco até à sua análise. No total, foram conseguidas quarenta amostras de urina.

d) **Recolha de cabelo:** Na recolha das amostras de cabelo, deve ser tido em conta que o cabelo deve ser cortado de preferência na região occipital da cabeça. Este local de recolha é já padronizado porque é menos susceptível à contaminação externa (Pozebon, D. et al., 1999). Também deve ser tido em conta que o cabelo deve ser cortado o mais próximo possível da raiz, pois sabe-se que os segmentos de folículos pilosos que ainda são biologicamente ativos são os mais representativos (Pozebon, D. et al., 1999).

Assim, recolheu-se cerca de 1 g de cabelo, na região logo acima do pescoço, a cerca de 1 cm do couro cabeludo, com uma tesoura de aço inoxidável. Cabelos coloridos artificialmente não foram recolhidos, porque podiam estar contaminados com determinados elementos.

A ideia inicial era recolher amostras de cabelo de todas as pessoas que participaram neste estudo, no entanto houve algumas dificuldades, nomeadamente quanto à cedência de tão grande quantidade de cabelo. Assim sendo, apenas foram conseguidas três amostras, duas delas pertencentes a pessoas que não bebem vinho e uma amostra referente a uma pessoa que bebe vinho.

Após o corte, cada amostra de cabelo foi guardada em sacos de plástico com fecho zip. Estes foram armazenados à temperatura ambiente, num local seco até ao seu tratamento.

e) **Recolha de unhas:** Foram deixados frascos de polipropileno com as pessoas para que recolhessem as unhas das mãos, durante cerca de dois meses. Foi dada preferência às unhas das mãos, uma vez que estas crescem mais rápido e estão menos sujeitas a contaminações fúngicas do que as unhas dos pés (Slotnick, M. J. and Nriagu, J. O., 2006). As unhas foram posteriormente levadas para o laboratório e mantidas à temperatura ambiente até que fosse dado início o seu tratamento.

O ideal era que se recolhesse cerca de 1 g de unhas de cada amostra. Contudo, aquando do tratamento verificou-se que nem todas as amostras continham a quantidade necessária para análise (considerou-se no mínimo 0,1 g) e por isso essas amostras não foram utilizadas. Assim sendo, foram analisadas trinta e uma amostras de unhas.

4.5. Determinação do pH das amostras de solo

Para determinar o pH, o método de maior sensibilidade é o uso de um eletrodo de pH, um dispositivo eletroquímico que mede a concentração de H^+ em solução. O eletrodo é parcialmente submerso na solução a medir, produzindo então uma corrente elétrica proporcional à concentração de H^+ , que é convertida num valor numérico (Eaton, A. D., et al., 2005).

A determinação do pH das amostras de solo foi feita segundo o método da EPA 9045D, em que a amostra de solo é misturada com água e o pH resulta da medição desta solução.

Na preparação das amostras de solo para determinação do pH, pesar 20 g de solo para um copo de vidro, adicionar 20 ml de água ultrapura, tapar com parafilme e manter em agitação durante 5 minutos. Centrifugar durante 30 minutos, a 2500 rpm, e transferir o centrifugado para copos de medição de pH.

Iniciar a calibração com a leitura das soluções tampão pela seguinte ordem: tampão 4,0, tampão 7,0 e tampão 10,0, e retirar os valores de zero pH e sensibilidade, em que o eletrodo tem bom desempenho quando o zero pH é $6,65 \pm 0,5$ e a sensibilidade é superior a 97%. Em seguida, fazer a verificação da calibração, efetuando leituras aos tampões de controlo (tampão 4,0, tampão 7,0 e tampão 10,0), em que o desvio em relação aos valores tabelados deve ser inferior a $\pm 0,04$. Efetuar a leitura ao tampão de controlo 7,413 e comparar o resultado com o valor tabelado. Se se verificarem todos os padrões, ler então o pH das amostras de solo, e sempre que necessário verificar o desempenho pelos tampões de controlo.

As amostras foram lidas em duplicado e o desvio entre os dois duplicados deve ser inferior a $\pm 0,05$. No fim da leitura das amostras efetuar leitura ao tampão de controlo 7,413. Os resultados obtidos para o pH estão representados no Gráfico 2 e no Anexo II.

4.6. Tratamento das amostras

O processo de digestão das amostras é feito de modo a reduzir as interferências por matéria orgânica e converter, metais associados a partículas, para uma forma normalmente de metal livre, que possa ser determinada pelas técnicas analíticas.

Estudos acerca da presença de aniões interferentes convergem no sentido de apontar NO_3^- como sendo o anião menos interferente, o que leva à utilização preferencial de HNO_3 , quer na acidificação das amostras quer nos tratamentos ácidos quando necessários (Eaton, A. D., et al., 2005).

a) **Solo:** Antes de fazer a digestão das amostras de solo foi necessário determinar a percentagem de matéria seca de cada amostra. Este procedimento permite saber qual a massa de amostra que se deve pesar para os digestores, para posteriormente se fazer a sua digestão.

No processo de determinação da percentagem de matéria seca de amostras de solo determina-se a massa perdida quando uma porção da amostra de solo homogeneizada é colocada numa cápsula de porcelana e submetida a um processo de secagem, numa estufa a $105^\circ \text{C} \pm 5^\circ \text{C}$, até o peso ser constante. A diferença de massa antes e após a secagem é usada para determinar a percentagem de matéria seca.

Assim, colocar a cápsula vazia na estufa a 105°C durante cerca de 1 hora. Após esse tempo, retirar e colocar no exsicador à temperatura ambiente durante 1 hora e pesar. Repetir este processo até que o peso seja constante, m_{cap} . A quantidade de amostra a pesar para a cápsula depende da quantidade de água que a amostra parece conter, m_{solo} . Neste caso, foi pesado para cada cápsula, aproximadamente 10 g de solo. Colocar então a cápsula com a amostra de solo na estufa a 105°C até que o solo pareça seco. Em seguida, colocar a arrefecer no exsicador e 1 hora depois pesar a cápsula, $m_{\text{cap+solo}}$. A matéria seca fica a peso constante se a massa obtida após mais um ciclo de secagem não diferir mais do que 0,5% da última perda de massa. Caso não se verifique, efetuar mais ciclos de secagem, exsicador e pesagem até que a massa seja constante. Calcular a percentagem de matéria seca da seguinte forma:

$$MS = \frac{m_{\text{cap+solo}} - m_{\text{cap}}}{m_{\text{solo}}} \times 100\% \quad (1)$$

MS - Matéria seca da amostra, em percentagem;

$m_{\text{cap+solo}}$ - Massa da cápsula contendo a amostra de solo seca, em gramas;

m_{cap} - Massa da cápsula vazia, em gramas;

m_{solo} - Massa da cápsula contendo a amostra de solo, em gramas.

Os resultados das percentagens de matéria seca de todas as amostras de solo e as massas de solo a pesar para cada digestor estão no Anexo III.

Uma vez que a EPA tem recomendado a digestão no micro-ondas, este método foi escolhido para digerir as amostras de solo, pois este parece ser o procedimento mais eficiente e o mais adequado para este tipo de amostra. Para fazer a digestão das amostras de solo, pesar uma massa aproximada a partir da percentagem de matéria seca determinada (Anexo III). A um dos digestores (branco) em vez de solo, adicionar 10 ml de água ultrapura e nos restantes colocar as amostras de solo. A todos os digestores adicionar 5 ml de HNO_3 e 2 ml de H_2O_2 . Aplicar este esquema de digestão para todas as amostras de solo.

Depois de todas as adições, colocar os digestores dentro dos vasos de Teflon, e colocar no micro-ondas escolhendo um programa típico de pressão, que garanta que as amostras são bem digeridas. Não foi aplicado um programa de temperaturas, uma vez que o equipamento tinha a sonda de temperatura danificada. A Tabela 17 apresenta o programa de pressão escolhido para a digestão das amostras de solo e também de cabelo.

Tabela 17 - Esquema do programa utilizado na digestão no micro-ondas das amostras de solo e de cabelo.

ETAPA	TEMPO (min)	POTÊNCIA (W)	PRESSÃO (Bares)
1	01:00	300	60
2	05:00	0	60
3	05:00	300	60
4	02:00	0	60
5	05:00	400	60
6	02:00	0	60
7	05:00	500	60

Após o programa terminar, filtrar o conteúdo de cada digestor e perfazer com água

ultrapura para um volume final de 100 ml. O digerido resultante do digestor 1 não é aproveitado, uma vez que este digestor serve apenas para controlar a pressão.

As soluções de solo obtidas pela digestão no micro-ondas foram diluídas com HNO₃ 2% para análise em ICP-AES e diluídas com HNO₃ 0,5% para análise em GFAAS. As diluições foram preparadas conforme o pH que foi obtido para cada amostra (ver ponto 4.5.), segundo os limites máximos estabelecidos no Decreto-Lei n.º 276/2009 para cada um dos elementos (Tabela 4) e também segundo as gamas de concentração e os limites de quantificação para cada elemento nas técnicas utilizadas (Tabelas 18 e 19).

b) Vinho: Devido ao alto teor de compostos orgânicos no vinho, é aconselhável que haja tratamento da amostra, em que o procedimento mais comum de preparação das amostras de vinhos é a digestão ácida ou uma simples diluição da amostra (Bentlin, F., et al., 2011; Pohl, P., 2007). Embora uma simples diluição seja mais rápida, nem todos os elementos podem ser corretamente determinados deste modo (Bentlin, F., et al., 2011). A digestão ácida das amostras de vinho foi realizada de modo a destruir a matéria orgânica e a fim de evitar possíveis interferências.

Para análise dos elementos Cu, Fe e Zn no ICP-AES, as amostras de vinho foram submetidas a uma digestão na placa. Assim, num copo de vidro adicionar 4 ml de vinho, em seguida juntar 2 ml de HNO₃ e 1 ml de H₂O₂ e colocar na placa de aquecimento a 80° C até que a solução fique incolor e completamente límpida. Diluir a solução resultante com água ultrapura para um volume final de 100 ml.

Para análise de Ni em GFAAS apenas foram feitas diluições com HNO₃ 0,5%.

c) Urina: Para análise de Cu, Fe e Zn em FAAS, as amostras de urina foram diluídas com água ultrapura. Não foi possível fazer a análise de Ni nesta matriz.

d) Cabelo: O procedimento de lavagem das amostras de cabelo, para remoção da sujidade, foi realizado de acordo com as recomendações da IAEA (1985). Para isso, pesar aproximadamente 0,5 g de cada amostra de cabelo e cortar cada amostra em pequenos segmentos. Em seguida, efetuar as lavagens pela seguinte ordem: lavagem com acetona, três lavagens com água ultrapura e novamente com acetona, sendo as amostras imersas, em

cerca, de 25 ml de acetona ou de água ultrapura, durante 20 minutos com agitação. Depois das amostras serem lavadas, colocar a secar na estufa a 75° C durante 24 horas e em seguida, pesar novamente as amostras de cabelo.

Seguidamente foi feita a digestão das amostras de cabelo no micro-ondas, uma vez que a digestão em sistema fechado diminui o risco de contaminação e a perda de elementos voláteis (Pozebon, D. et al., 1999). Para isso, colocar em cada um dos digestores uma dada massa de cada uma das amostras de cabelo (Anexo IV), sendo que no branco se adiciona 10 ml de água ultrapura em vez de amostra, e juntar a cada um dos digestores 5 ml de HNO₃ e 2 ml de H₂O₂. Utilizou-se o mesmo programa que foi usado no tratamento das amostras de solo (Tabela 17). Diluir as amostras resultantes da digestão com água ultrapura para um volume final de 20 ml.

Na análise das amostras de cabelo, dos elementos Cu, Fe e Zn em ICP-AES, foi necessário diluir as amostras com HNO₃ 2% e na análise das amostras de cabelo do elemento Ni por GFAAS foi necessário diluir com HNO₃ 0,5%.

e) **Unhas:** Antes de iniciar a digestão das amostras de unhas é necessário fazer uma lavagem, de modo a retirar a sujidade ou contaminações externas que estas possam ter. Primeiramente, pesar as amostras de unhas. Amostras com massa inferior a 0,1 g não foram utilizadas pois os metais a determinar não seriam detetados em tão pouca quantidade de amostra.

Para efetuar a lavagem das unhas, mergulhar estas três vezes em detergente não iónico, 1% (v/v) Triton X-100. Em seguida, lavar três vezes em acetona e por último, enxaguar cinco vezes em água desionizada. Depois de lavadas, colocar as amostras a secar na estufa a 60° C, durante cerca de 2 horas. Pesar novamente as amostras de unhas e deixar no exsiccador até se proceder à sua digestão.

As amostras de unhas foram sujeitas a uma digestão ácida na placa, que permite a destruição da matéria orgânica e obter o metal na sua forma elementar. Às amostras de unhas já secas (Anexo V), adicionar 10 ml de uma solução 6:1 de mistura de HNO₃ concentrado e HClO₄ e manter à temperatura ambiente durante a noite. Subsequentemente, colocar as amostras na placa de aquecimento a 160° C, até que as unhas estejam completamente dissolvidas. Todo o procedimento de lavagem e tratamento das unhas foi

baseado em procedimentos descritos por Hussein Were, F. et al. (2008) e Mehra, R. and Juneja, M. (2005). Cada uma das soluções das amostras digeridas foi recuperada para um volume de 25 ml com 0,1 M de HNO₃.

Na análise dos elementos Cu, Fe e Zn por ICP-AES nas amostras de unhas, o elemento Cu foi analisado sem diluições em todas as amostras mas para os elementos Fe e Zn foi necessário diluir para a maioria das amostras com HNO₃ 2%.

Optou-se que o elemento Ni também fosse analisado no ICP-AES, uma vez que na digestão das amostras de unhas se adicionaram grandes quantidades de HNO₃ e HClO₄, o que poderia causar interferências de matriz, caso as amostras de unhas fossem analisadas por GFAAS.

4.7. Preparação de soluções

➤ Preparação das soluções de calibração para determinação de Cu, Fe e Zn em ICP-AES

a) Preparação das soluções intermédias: As soluções intermédias constituem um passo auxiliar na preparação dos padrões de calibração e são preparadas a partir de soluções mãe.

- **Solução intermédia A:** Para um balão volumétrico de 100 ml, medir 4 ml da solução mãe de Cu, 4 ml da solução mãe de Fe e 2 ml da solução mãe de Zn e aferir o volume com HNO₃ 2%. As concentrações para cada elemento nesta solução são: ≈40,0 mg/L de Cu, ≈40,0 mg/L de Fe e ≈20,0 mg/L de Zn.
- **Solução intermédia B:** Para um balão volumétrico de 100 ml, medir 5 ml da solução intermédia A e aferir o volume com HNO₃ 2%. As concentrações para cada elemento nesta solução são: ≈2,00 mg/L de Cu, ≈2,00 mg/L de Fe e ≈1,00 mg/L de Zn.

b) Preparação dos padrões de calibração:

- **Padrão de calibração S5:** Para um balão volumétrico de 100 ml, medir 2 ml da

solução intermédia A e aferir o volume com HNO₃ 2%. As concentrações para cada elemento nesta solução são: ≈800 µg/L de Cu, ≈800 µg/L de Fe e ≈400 µg/L de Zn.

- **Padrão de calibração S4:** Para um balão volumétrico de 50 ml, medir 10 ml da solução intermédia B e aferir o volume com HNO₃ 2%. As concentrações para cada elemento nesta solução são: ≈400 µg/L de Cu, ≈400 µg/L de Fe e ≈200 µg/L de Zn.
- **Padrão de calibração S3:** Para um balão volumétrico de 100 ml, medir 10 ml da solução intermédia B e aferir o volume com HNO₃ 2%. As concentrações para cada elemento nesta solução são: ≈200 µg/L de Cu, ≈200 µg/L de Fe e ≈100 µg/L de Zn.
- **Padrão de calibração S2:** Para um balão volumétrico de 100 ml, medir 5 ml da solução padrão de calibração S5 e aferir o volume com HNO₃ 2%. As concentrações para cada elemento nesta solução são: ≈40 µg/L de Cu, ≈40 µg/L de Fe e ≈20 µg/L de Zn.

c) **Preparação de soluções padrões de controlo:** São preparadas a partir da solução multi-elemento e permitem assegurar o controlo de qualidade do método, bem como vigiar a curva de calibração.

- **Solução de controlo ICM 2:** Para um balão volumétrico de 50 ml, medir 1 ml da solução multi-elemento e aferir o volume com HNO₃ 2%. As concentrações para cada elemento nesta solução são: ≈2 mg/L de Cu, ≈2 mg/L de Fe e ≈2 mg/L de Zn.
- **Solução de controlo ICM 20:** Para um balão volumétrico de 100 ml, medir 1 ml da solução ICM 2 e aferir o volume com HNO₃ 2%. As concentrações para cada elemento nesta solução são: ≈20 µg/L de Cu, ≈20 µg/L de Fe e ≈20 µg/L de Zn.
- **Solução de controlo ICM 40:** Para um balão volumétrico de 100 ml, medir 2

ml da solução ICM 2 e aferir o volume com HNO₃ 2%. As concentrações para cada elemento nesta solução são: ≈40 µg/L de Cu, ≈40 µg/L de Fe e ≈40 µg/L de Zn.

- **Solução de controlo ICM 200:** Para um balão volumétrico de 50 ml, medir 5 ml da solução ICM 2 e aferir o volume com HNO₃ 2%. As concentrações para cada elemento nesta solução são: ≈200 µg/L de Cu, ≈200 µg/L de Fe e ≈200 µg/L de Zn.

d) Preparação do branco: Preparar uma solução de HNO₃ 2%, ou seja, medir 20 ml de HNO₃ concentrado para um balão de diluição de 1000 ml que contém água ultrapura e aferir o volume com água ultrapura.

e) Preparação de amostras fortificadas: A uma amostra é adicionada uma quantidade conhecida do analito de interesse. Os resultados da amostra fortificada são comparados com a amostra sem ser fortificada e é feito o cálculo da percentagem de recuperação. Este controlo serve para avaliar a recuperação do método e para averiguar a existência de interferências de matriz. Deve garantir-se que a concentração final da amostra fortificada se encontra dentro da gama de concentrações do método.

No caso da preparação de amostras fortificadas para análise de Cu, Fe e Zn em ICP-AES, para um balão volumétrico, medir uma determinada quantidade da solução de controlo ICM 2 e perfazer o volume com a amostra que se quer fortificar.

➤ **Preparação das soluções de calibração para determinação de Cu, Fe e Zn em FAAS**

a) Preparação da solução intermédia e das soluções padrão: As soluções padrão preparadas servem de padrões de calibração e de padrões de controlo.

- **Solução intermédia, 50 mg/L:** Para um balão volumétrico de 50 ml, medir 2,50 ml da solução mãe de Cu, Fe ou Zn, conforme o elemento a analisar e aferir o volume com água ultrapura.

- **Solução padrão S2, 0,2 mg/L:** Medir 0,2 ml da solução intermédia, para um balão de diluição de 50 ml e ajustar o volume com água ultrapura.
- **Solução padrão S3, 0,4 mg/L:** Medir 0,4 ml da solução intermédia, para um balão de diluição de 50 ml e ajustar o volume com água ultrapura.
- **Solução padrão S4, 0,6 mg/L:** Medir 0,6 ml da solução intermédia, para um balão de diluição de 50 ml e ajustar o volume com água ultrapura.
- **Solução padrão S5, 0,8 mg/L:** Medir 0,8 ml da solução intermédia, para um balão de diluição de 50 ml e ajustar o volume com água ultrapura.
- **Solução padrão S6, 1,0 mg/L:** Medir 1,0 ml da solução intermédia, para um balão de diluição de 50 ml e ajustar o volume com água ultrapura.

b) Preparação do branco: O branco utilizado é água ultrapura.

c) Preparação de amostras fortificadas: Para um balão volumétrico, medir uma determinada quantidade da solução intermédia e perfazer o volume com a amostra que se quer fortificar.

➤ **Preparação das soluções de calibração para determinação de Ni em GFAAS**

a) Preparação das soluções intermédias e padrão de calibração:

- **Solução padrão A de Ni, 50 µg/ml:** Medir 5 ml da solução mãe para um balão de diluição de 100 ml e ajustar o volume com HNO₃ 0,5%.
- **Solução padrão B de Ni, 2,50 µg/ml:** Medir 5 ml da solução padrão A para um balão de diluição de 100 ml e ajustar o volume com HNO₃ 0,5%.
- **Solução padrão C de Ni, 0,250 µg/ml:** Medir 10 ml da solução padrão B para um balão de diluição de 100 ml e ajustar o volume com HNO₃ 0,5%.
- **Solução padrão S5, 25 µg/L:** Medir 10 ml da solução padrão C para um balão

de diluição de 100 ml e ajustar o volume com HNO_3 0,5%.

As restantes soluções padrão (S1, S2, S3 e S4) são preparadas automaticamente, por diluição inteligente a partir da solução padrão S5. As concentrações das soluções padrão S1, S2, S3 e S4 são, respetivamente, 5, 10, 15 e 20 $\mu\text{g/L}$.

b) Preparação de soluções padrão de controlo:

- **Solução padrão, 1000 $\mu\text{g/L}$:** Medir 1 ml da solução multi-elemento para um balão volumétrico de 100 ml e ajustar o volume com HNO_3 0,5%.
- **Solução padrão, 100 $\mu\text{g/L}$:** Medir 10 ml da solução de 1000 $\mu\text{g/L}$ para um balão volumétrico de 100 ml e ajustar o volume com HNO_3 0,5%.
- **Solução padrão, 10 $\mu\text{g/L}$:** Medir 10 ml da solução de 100 $\mu\text{g/L}$ para um balão volumétrico de 100 ml e ajustar o volume com HNO_3 0,5%.
- **Solução padrão, 5 $\mu\text{g/L}$:** Medir 5 ml da solução de 100 $\mu\text{g/L}$ para um balão volumétrico de 100 ml e ajustar o volume com HNO_3 0,5%.

c) Preparação do branco e diluente: Preparar uma solução de HNO_3 0,5%, ou seja, medir 5 ml de HNO_3 concentrado para um balão de diluição de 1000 ml que contém água ultrapura.

d) Preparação de amostras fortificadas: As fortificações em GFAAS geralmente são fortificações de 10 $\mu\text{g/L}$, preparadas a partir da solução padrão de 100 $\mu\text{g/L}$, e perfazer o volume com a amostra que se quer fortificar.

➤ **Preparação das soluções de calibração para determinação de Ni em ICP-AES**

a) Preparação das soluções intermédias e padrão de calibração:

- **Solução intermédia A, 100 mg/L :** Para um balão volumétrico de 100 ml, medir 10 ml da solução mãe e aferir o volume com HNO_3 2%.

- **Solução intermédia B, 5,0 mg/L:** Para um balão volumétrico de 100 ml, medir 5 ml da solução intermédia A e aferir o volume com HNO₃ 2%.
- **Padrão de calibração S5, 2000 µg/L:** Para um balão volumétrico de 100 ml, medir 2 ml da solução intermédia A e aferir o volume com HNO₃ 2%.
- **Padrão de calibração S4, 1000 µg/L:** Para um balão volumétrico de 50 ml, medir 10 ml da solução intermédia B e aferir o volume com HNO₃ 2%.
- **Padrão de calibração S3, 500 µg/L:** Para um balão volumétrico de 100 ml, medir 10 ml da solução intermédia B e aferir o volume com HNO₃ 2%.
- **Padrão de calibração S2, 100 µg/L:** Para um balão volumétrico de 100 ml, medir 5 ml da solução de calibração S5 e aferir o volume com HNO₃ 2%.

b) Preparação de soluções de controlo:

- **Solução de controlo ICM 2:** Para um balão volumétrico de 50 ml, medir 1 ml da solução multi-elemento e aferir o volume com HNO₃ 2%. A concentração de Ni nesta solução é: ≈2 mg/L.
- **Solução de controlo ICM 100:** Para um balão volumétrico de 50 ml, medir 2,5 ml da solução ICM 2 e aferir o volume com HNO₃ 2%. A concentração de Ni nesta solução é: ≈100 µg/L.
- **Solução de controlo ICM 200:** Para um balão volumétrico de 50 ml, medir 5 ml da solução ICM 2 e aferir o volume com HNO₃ 2%. A concentração de Ni nesta solução é: ≈200 µg/L.

c) Preparação do branco: Preparar uma solução de HNO₃ 2%, ou seja, medir 20 ml de HNO₃ concentrado para um balão de diluição de 1000 ml que contém água ultrapura e aferir o volume com água ultrapura.

d) Preparação das fortificações: Para um balão volumétrico, medir uma determinada quantidade da solução de controlo ICM 2 e perfazer o volume com a amostra

que se quer fortificar.

4.8. Análise

Antes de mais é necessário saber quais as gamas de concentração e os LQ dos elementos Cu, Fe, Zn e Ni para as técnicas utilizadas. Estes dados são apresentados nas Tabelas 18 e 19.

Tabela 18 - Gamas de concentração dos elementos estudados para as técnicas utilizadas.

	ICP-AES	GFAAS	FAAS
Cu	20-800 µg/L	-----	200-1000 µg/L
Fe	20-800 µg/L	-----	200-1000 µg/L
Zn	20-400 µg/L	-----	200-1000 µg/L
Ni	100-2000 µg/L	5-25 µg/L	-----

Tabela 19 - LQ dos elementos estudados para as técnicas utilizadas.

	ICP-AES	GFAAS	FAAS
Cu	20 µg/L	-----	200 µg/L
Fe	20 µg/L	-----	200 µg/L
Zn	20 µg/L	-----	200 µg/L
Ni	100 µg/L	5 µg/L	-----

➤ **Determinação de Cu, Fe, Zn e Ni por ICP-AES:**

O procedimento de análise em ICP-AES foi realizado conforme o Manual de operações do equipamento “UNICAM 701 Series ICP Systems”. Os elementos em estudo apresentam os seguintes comprimentos de onda:

Tabela 20 - Comprimentos de onda para os elementos Cu, Fe, Zn e Ni.

Analito	Comprimento de onda (nm)
Cu	324,754
Fe	259,940
Zn	213,856
Ni	231,604

Definir as condições de operação do ICP-AES, sumariadas na Tabela 21.

Tabela 21 - Condições de operação do ICP-AES.

Potência (kW)	1,0
Fluxo do gás de refrigeração (L/min)	13
Fluxo do gás do nebulizador (psi)	38
Fluxo do gás auxiliar (L/min)	0,0
Fluxo líquido da amostra (ml/min)	1,0
Fluxo do gás de refrigeração de arranque (ml/min)	11

Aquando da verificação das condições de funcionamento do espectrômetro, fazer o teste do Árgon prosseguindo a análise se o $RSD \leq 0,5\%$, caso contrário, repetir o teste. O teste do Árgon é realizado para verificar a estabilidade do plasma e a qualidade do aerossol.

Fazer um “Peak Optics”, que permite o alinhamento do espectrômetro, com a lâmpada de mercúrio. Registrar as intensidades obtidas na realização do “Peak Source”, que é feito com uma solução de Mn a 100 ppm. Aceitar e prosseguir a análise se os “Scans” para este elemento se encontrarem centrados, tanto a nível de coordenadas x como y e se o nível de contagens for superior a 800000. O “Peak Source” permite escolher a zona ótima de trabalho do plasma.

Começar então a calibração analítica. A calibração é efetuada com um branco (S1) e quatro padrões (S2, S3, S4 e S5). Antes de iniciar a leitura dos padrões, efetuar um “Scan” ao padrão mais alto, S5, sendo desta forma possível verificar se as linhas de emissão estão corretamente centradas, bem como a evolução da intensidade ao longo do tempo. Em

seguida, aspirar branco até assegurar, através do “Scan” que o sistema está limpo, isto é, a linha de base para cada um dos elementos a analisar, no seu comprimento de onda característico apresenta o menor ruído possível. Iniciar a calibração pela leitura do branco, a seguir o padrão de menor concentração, S2, e continuar sucessivamente até ao mais concentrado, S5. O *software* estabelece uma curva de calibração para cada analito, efetuando a regressão linear entre a concentração dos padrões (eixo dos xx) e a intensidade do sinal (eixo dos yy). Analisar as retas de calibração obtidas, em que a representação gráfica da reta de calibração deve evidenciar a linearidade da gama de trabalho, ou seja, o coeficiente de correlação deve ser $\geq 0,9999$.



Figura 9 - Espectrómetro de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado utilizado neste trabalho.

Após aceitar a reta de calibração e para fazer a verificação desta, ler um branco. A análise do branco permite controlar a existência de interferências nos reagentes, material ou no ambiente do laboratório.

De seguida, para os elementos Cu, Fe e Zn ler o padrão ICM 20, ICM 40 e, por último, o padrão ICM 200. Para o Ni ler os padrões ICM 100 e ICM 200. Os desvios obtidos são avaliados, através da Equação 2:

$$D = \frac{C_{\text{medida}} - C_{\text{padrão}}}{C_{\text{padrão}}} \times 100\% \quad (2)$$

D - Desvio relativo;

C_{medida} - Concentração do padrão obtida experimentalmente;

$C_{\text{padrão}}$ - Concentração do padrão.

Prosseguir a análise se o resultado da leitura do padrão ICM 20 apresentar $D \leq 15\%$ para o Cu, Fe e Zn e se a leitura do padrão ICM 100 apresentar também $D \leq 15\%$ para o Ni. Para os padrões ICM 40 e ICM 200 considera-se aceitável se $D \leq 10\%$ para todos os elementos.

Começar então a leitura das amostras. Após cada run de amostras ler o padrão cuja concentração corresponda à que se queira validar e avaliar os desvios relativos. Por cada série de dez amostras analisar uma amostra fortificada e uma amostra em duplicado.

Calcular a percentagem de recuperação para cada analito na amostra fortificada através de uma das equações (3) ou (4), conforme a concentração do elemento na amostra seja superior ou inferior ao LQ:

a) Se a amostra for superior ao LQ

$$\text{Rec} = \frac{C_{\text{amF}} - C_{\text{am}}}{C_{\text{Fort}}} \times 100\% \quad (3)$$

b) Se a amostra for inferior ao LQ

$$\text{Rec} = \frac{C_{\text{amF}}}{C_{\text{Fort}}} \times 100\% \quad (4)$$

Rec - Percentagem de recuperação;

C_{amF} - Concentração do analito na amostra fortificada;

C_{am} - Concentração do analito na amostra;

C_{Fort} - Concentração da fortificação.

Aceitar os resultados obtidos, se o valor calculado se encontrar entre 85% e 125%.

A análise de duplicados permite avaliar a repetibilidade dos resultados e a despistagem de erros aleatórios. O afastamento relativo obtido entre os duplicados é obtido pela seguinte equação:

$$D_{\text{dup}} = \frac{|C_{\text{am}} - C_{\text{dup}}|}{C_{\text{med}}} \times 100\% \quad (5)$$

D_{dup} - Desvio duplicado;

C_{am} - Concentração obtida na leitura da amostra;

C_{dup} - Concentração obtida na leitura do duplicado;

C_{med} - Média aritmética das duas concentrações anteriores.

Aceitar os resultados se $D_{\text{dup}} \leq 15\%$ no LQ e 10% nas restantes concentrações.

Para o cálculo de resultados, a concentração na amostra é calculada pelo *software*, o qual utiliza o seguinte algoritmo:

[Analito] = Intensidade Emissão (1 leitura) x Declive - Ordenada na origem

➤ **Determinação de Cu, Fe e Zn em FAAS:**

Para proceder à análise das amostras em FAAS, instalar e alinhar a lâmpada de cátodo oco específica para o elemento a analisar (lâmpada de cátodo oco de Cu, Fe ou Zn).



Figura 10 - Espectrómetro de Absorção Atômica na Chama utilizado neste trabalho.

Construir a curva de calibração com a leitura de um branco e de cinco padrões de concentração 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 mg/L, e verificar a reprodutibilidade da curva de calibração, lendo a seguir ao último padrão, um branco. Em seguida, ler as soluções padrão de controlo 0,2 mg/L e 0,4 mg/L e avaliar os desvios relativos através da Equação 2.

Continuar com a análise se o resultado do padrão de 0,2 mg/L apresenta $D \leq 15\%$ e se o resultado do padrão de 0,4 mg/L apresenta $D \leq 10\%$.

Antes de iniciar a análise das amostras, efetuar a análise de um branco e controlar o sinal deste. Efetuar então a análise das amostras e, por cada conjunto de dez ou quinze amostras, efetuar a leitura de brancos e dos padrões de controlo consoante as concentrações das amostras, para validar os resultados. Por cada conjunto de dez ou no máximo de quinze amostras ou sempre que se suspeitar de interferência de matriz fazer a leitura de uma amostra fortificada e determinar a recuperação da amostra fortificada, segundo a Equação 3 ou 4. Aceitar os resultados obtidos, se a percentagem de recuperação se encontrar entre 80 e 120%.

Por cada conjunto de dez amostras, efetuar a análise de duplicados de amostras e avaliar o resultado obtido através da determinação dos desvios duplicados (Equação 5), o qual não deve exceder 10%.

Para o cálculo de resultados, a concentração na amostra é calculada pelo *software*, o qual utiliza o seguinte algoritmo:

$$[\text{Analito}](\text{mg/L}) = \frac{\overline{\text{Absorvância}} (3 \text{ leituras}) - \text{Absorvância origem}}{\text{Declive}}$$

➤ **Determinação de Ni em GFAAS:**

Para a determinação de Ni em GFAAS, executar a instalação e alinhamento da lâmpada específica para análise de Ni, a lâmpada de deutério e a câmara de grafite. O comprimento de onda adoptado para o Ni é de 232,0 nm, e para comprimentos de onda inferiores a 300 nm é necessário seleccionar a correção de fundo. Seleccionar também a opção de diluição inteligente, que automaticamente prepara os outros padrões da curva a partir do padrão S5. Seleccionar também a opção de “volume fixo” em que é injetado, de cada copo do autosampler, 20 µl de solução na câmara de grafite.

Escolher as condições ótimas para que o programa de temperaturas seja adequado na análise de Ni. As condições escolhidas foram as seguintes:

Tabela 22 - Esquema de fases de temperaturas aplicadas.

Fase	Temperatura (°C)	Tempo (segundos)	Rampa (°C/s)	Tipo de gás	Fluxo de gás
1	120	30,0	10	2	0,2 L/min
2	900	20,0	50	2	0,2 L/min
3	2500	3,0	0	2	Off
4	2800	3,0	0	2	0,3 L/min

Instalar o tubo de grafite na câmara de grafite, fazer um “Peak Optics” e fazer uma queima ao tubo de grafite. Em seguida, colocar as amostras a analisar, utilizando HNO₃ 0,5% como branco e diluente e a Master Standard será a solução padrão S5.

Fazer a análise de um branco e controlar o sinal deste, em que o valor da absorvância deverá ser $\leq 0,030$. Em seguida, verificar a sensibilidade do equipamento através da leitura da absorvância do último padrão da curva (S5, 25 µg/L) e aceitar as condições se o valor de absorvância apresentar um $D \leq 25\%$ e verificar se o valor da absorvância está de acordo com as cartas de controlo estabelecidas para o método, caso esteja, pode continuar-se a análise.



Figura 11 - Espectrômetro de Absorção Atômica em Câmara de Grafite utilizado neste trabalho.

Prosseguir a análise começando a construir a curva de calibração com o branco e os cinco padrões da curva (5, 10, 15, 20 e 25 µg/L), considerando-se aceitável $D \leq 3,0\%$ para todos os padrões. Analisar a curva de calibração obtida de acordo com os seguintes critérios

de aceitação: o coeficiente de correlação deve ser $r \geq 0,999$, o resultado do padrão 5 $\mu\text{g/L}$ deve apresentar $D \leq 15\%$ e o resultado do padrão 10 $\mu\text{g/L}$ deve ser $D \leq 10\%$.

Verificar a reprodutibilidade da curva de calibração, lendo a seguir ao último padrão da curva, um branco, um padrão de controlo 5,0 $\mu\text{g/L}$ e um padrão de controlo 10,0 $\mu\text{g/L}$ e avaliar os desvios relativos destes padrões através da Equação 2, prosseguindo a análise se $D(5 \mu\text{g/L}) \leq 15\%$ e $D(10 \mu\text{g/L}) \leq 10\%$.

Antes de iniciar a análise das amostras efetuar a análise de um branco. Começar então a leitura das amostras e por cada conjunto de dez ou no máximo de quinze amostras fazer a análise de dois brancos e de dois padrões de controlo 5 $\mu\text{g/L}$ e 10 $\mu\text{g/L}$ e verificar se os critérios estão de acordo com o estabelecido anteriormente.

Por cada conjunto de dez ou no máximo de quinze amostras, ou sempre que se suspeitar que pode existir interferência de matriz, fazer a leitura de uma amostra fortificada e avaliar a percentagem de recuperação da amostra fortificada, através das equações 3 ou 4, dependendo se a concentração do analito na amostra é superior ou inferior ao LQ. Aceitar os resultados obtidos, se o valor calculado se encontrar entre 80% e 120% para amostras superiores ao LQ e entre 80% e 149% se a amostra for inferior ao LQ.

Efetuar a análise de duplicados de amostras por cada conjunto de dez amostras e avaliar o resultado obtido através da Equação 5. Aceitar os resultados se $D_{\text{dup}} \leq 15\%$ no LQ e 10% nas restantes concentrações.

No cálculo de resultados, a concentração de Ni na amostra é calculada pelo *software*, o qual utiliza o seguinte algoritmo:

$$[\text{Ni}](\mu\text{g/L}) = \frac{\overline{\text{Absorvância}} (3 \text{ leituras}) - \text{Absorvância origem}}{\text{Declive}}$$

4.9. Quantificação dos elementos

Em seguida é apresentado um exemplo dos cálculos utilizados para quantificar os elementos nas amostras.

No caso do solo, os resultados são dados em $\mu\text{g/L}$ e têm de ser convertidos em mg/kg . Por exemplo, para a amostra 25 de solo à superfície (0 cm), o resultado dado pelo equipamento para o elemento Fe é de 235 $\mu\text{g/L}$. É necessário multiplicar este valor pelo

fator de diluição, que neste caso foi de 1250:

$$235 \times 1250 = 293750 \mu\text{g/L}$$

$$293750 \mu\text{g} \text{-----} 1000 \text{ ml}$$

$$x \text{-----} 100 \text{ ml}$$

$$x = 29375 \mu\text{g de Fe}$$

Massa de solo pesada para o digestor aquando da digestão no micro-ondas: 1,0794 g

$$\frac{29375 \mu\text{g Fe} \times 10^{-3}}{1,0794 \text{ g} \times 10^{-3}} = 27214 \text{ mg Fe/Kg}$$

Assim, a amostra 25 apresenta 27214 mg de Fe por kg de solo.

Da mesma forma, são calculadas as concentrações dos restantes elementos para as amostras de solo, tendo sempre em conta os fatores de diluição.

No caso do vinho os resultados são dados em $\mu\text{g/L}$ e têm de ser convertidos em mg/L . Para a urina os resultados são dados em mg/L e têm de ser convertidos em $\mu\text{g/L}$. Para o cabelo e para as unhas os resultados são dados em $\mu\text{g/L}$ e têm de ser convertidos em $\mu\text{g/g}$. No caso de as amostras serem diluídas, não esquecer de multiplicar pelos respetivos fatores de diluição.

CAPÍTULO 5 - BIBLIOGRAFIA

- Decreto-Lei n.º 276/2009 de 2 de Outubro de 2009, publicado em Diário da República, 1.ª série - N.º 192.
- Adair, B. M., et al. (2006). Total arsenic concentrations in toenails quantified by two techniques provide a useful biomarker of chronic arsenic exposure in drinking water. *Environmental Research* **101**(2): 213-220.
- Afonso, J. (2009). O Solo da Vinha. *Revista de Vinhos*. <http://www.revistadevinhos.pt/artigos/show.aspx?seccao=segredos-do-vinho&artigo=10592&title=o-solo-da-vinha&idioma=pt> Acedido em: Janeiro 2013.
- Almeida, A., et al. (1999). Determination of transition metals in human hair by high-performance liquid chromatography using sodium hexadecane-sulfonate coated columns. *Talanta* **50**: 253-259.
- Almeida, L. (2005). *Atlas Geoquímico dos solos das Bacias Hidrográficas dos rios Douro e Mondego*. Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para obtenção do grau de Mestre, Universidade de Aveiro.
- Álvarez, M., et al. (2012). Mineral profile of “fino” wines using inductively coupled plasma optical emission spectrometry methods. *Food Chemistry* **135**(1): 309-313.
- Alvarez, M. A. and G. Carrillo (2012). Simultaneous determination of arsenic, cadmium, copper, chromium, nickel, lead and thallium in total digested sediment samples and available fractions by electrothermal atomization atomic absorption spectroscopy (ETAAS). *Talanta* **97**: 505-512.
- Amaral, A. F., et al. (2008). Essential and non-essential trace metals in scalp hair of men chronically exposed to volcanogenic metals in the Azores, Portugal. *Environ Int* **34**(8): 1104-1108.
- AMTQT. (2004). <http://www.amtqt.pt/infoMacedo/> Acedido em: Junho 2013.
- Analytik Jena AG *Fundamentals, Instrumentation and Techniques of Atomic Absorption Spectrometry*. Germany.
- Ashraf, W., et al. (1995). Age- And Sex-Based Comparative Distribution Of Selected Metals In The Scalp Hair Of An Urban Population From Two Cities In Pakistan. *Environmental Pollution* **87**: 61-64.
- Batista, B. L., et al. (2008). Simultaneous determination of Cd, Cu, Mn, Ni, Pb and Zn in nail samples by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) after

tetramethylammonium hydroxide solubilization at room temperature: comparison with ETAAS. *Talanta* **76**(3): 575-579.

- Baysal, A. and S. Akman (2011). A rapid solid sampling method for determination of nickel and copper along human hair by ETAAS. *Microchemical Journal* **98**(2): 291-296.
- Bega, A. (2006). Tratado de podologia. São Paulo: Yendis.
- Bentlin, F., et al. (2011). Elemental Analysis of Wines from South America and their Classification According to Country. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **22**(2): 327-336.
- Berliner, A., et al. (2004). Paisagem Protegida da Albufeira do Azibo, Plano de Ordenamento, Câmara Municipal de Macedo, versão provisória.
- Bermejo-Barrera, P., et al. (2002). Application of multivariate methods to scalp hair metal data to distinguish between drug-free subjects and drug abusers. *Analytica Chimica Acta* **455**: 253-265.
- Boss, C. B. and K. J. Fredeen (1989). *Concepts, instrumentation, and techniques in Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry*. USA, Perkin Elmer.
- Boumans, P. W. (1987). *Inductively Coupled Plasma Emission Spectroscopy - Methodology, Instrumentation and Performance*, John Wiley & Sons.
- Brown, M. B., et al. (2009). Overcoming the nail barrier: A systematic investigation of ungual chemical penetration enhancement. *Int J Pharm* **370**(1-2): 61-67.
- Brown, R. J. C. and M. J. T. Milton (2005). Analytical techniques for trace element analysis: an overview. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **24**(3): 266-274.
- Catarino, S., et al. (2002). Determination of Zinc in Wine by Flame Atomic Absorption Spectrometry (FAAS). *Ciência e Técnica Vitivinícola* **17**(1): 15-26.
- Catarino, S., et al. (2008). Contaminant Elements in Wines: A review. *Journal of Viticulture and Enology* **23** (1): 3-19.
- Charana, A. P. M. (2008). *Análise de metais em águas de consumo humano: comparação de métodos*. Dissertação de Mestrado, Universidade de Aveiro.
- Chojnacka, K., et al. (2006). The influence of living habits and family relationships on element concentrations in human hair. *The Science of the Total Environment* **366**(2-3): 612-620.
- Cornelis, R., et al. (1996). Sample Collection Guidelines for Trace Elements in Blood

and Urine. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **10**(2): 103-127.

- Crinnion, W. J. (2009). The Benefits of Pre- and Post-challenge Urine Heavy Metal Testing: Part 1. *Alternative Medicine Review* **14**(1).
- Cruz, N. (2011). *Contaminação de solos agrícolas numa área urbana em Portugal*. Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para obtenção do grau de Mestre, Universidade de Aveiro.
- Csuros, M. and C. Csuros (2000). *Environmental sampling and analysis for metals*. USA, Lewis Publishers.
- Daniel, C. R., et al. (2004). The nail and hair in forensic science. *Journal of the American Academy of Dermatology* **50**(2): 258-261.
- Dean, J. R. (1997). *Atomic Absorption and Plasma Spectroscopy*. Chichester, John Wiley & Sons. 2nd edition.
- Dias, R. M. S., et al. (2007). Cádmio, Cobre, Níquel e Zinco em solos com ocupação agrícola em Portugal. *Revista de Ciências Agrárias* **30**(2): 358-368.
- Eaton, A. D., et al. (2005). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 21st edition.
- EPA (2004). Method 9045D. Soil and Waste pH.
- Esteban, M. and A. Castano (2009). Non-invasive matrices in human biomonitoring: a review. *Environment International* **35**(2): 438-449.
- Fabani, M. P., et al. (2010). Evaluation of elemental profile coupled to chemometrics to assess the geographical origin of Argentinean wines. *Food Chemistry* **119**(1): 372-379.
- Fernández-Calviño, D., et al. (2009). Copper accumulation and fractionation in vineyard soils from temperate humid zone (NW Iberian Peninsula). *Geoderma* **153**(1-2): 119-129.
- Ferreira, I. (2004). *Dados geoquímicos de base de solos de Portugal Continental, utilizando amostragem de baixa densidade*. Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para obtenção do grau de Doutor, Universidade de Aveiro.
- Fiket, Ž., et al. (2011). Arsenic and other trace elements in wines of eastern Croatia. *Food Chemistry* **126**(3): 941-947.
- Freitas, F. (1984). *Acidez e Alcalinidade dos solos. Atlas do Ambiente*. Lisboa., Comissão Nacional do Ambiente. .
- Frimpong, N. A. and J. Louis-Charles (1989). Copper and zinc status in moderate

- alcohol intake. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **258**: 145-154.
- Galani-Nikolakaki, S., et al. (2002). Trace element analysis of Cretan wines and wine products. *The Science of the Total Environment* **285**(1-3): 155-163.
 - Garcia-Esparza, M. A., et al. (2006). Copper content of grape and wine from Italian farms. *Food additives and contaminants* **23**(3): 274-280.
 - Gasthalo, C., et al. (2009). *Determinação do pH e acidez de uma amostra de solo*, Faculdade de Farmácia Universidade de Coimbra.
 - Gil, F., et al. (2011). Biomonitorization of cadmium, chromium, manganese, nickel and lead in whole blood, urine, axillary hair and saliva in an occupationally exposed population. *The Science of the Total Environment* **409**(6): 1172-1180.
 - Gouille, J. P., et al. (2005). Metal and metalloid multi-elementary ICP-MS validation in whole blood, plasma, urine and hair. Reference values. *Forensic Sci Int* **153**(1): 39-44.
 - Grindlay, G., et al. (2009). Ultratrace determination of Pb, Se and As in wine samples by electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **652**(1-2): 154-160.
 - Harrison, P. and P. Arosio (1996). The ferritins molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochimica et Biophysica Acta* **1275**: 161-203.
 - Horng, C.-J., et al. (2002). Determination of urinary lead, cadmium and nickel in steel production workers. *Talanta* **56**: 1109-1115.
 - Hussein Were, F., et al. (2008). Use of human nails as bio-indicators of heavy metals environmental exposure among school age children in Kenya. *The Science of the Total Environment* **393**(2-3): 376-384.
 - IAEA (1985). Report on the Second Research Co-ordination Meeting of IAEA. Neuherberg, Germany.
 - Instituto da Vinha e do Vinho. <http://www.ivv.min-agricultura.pt/np4/76> Acedido em: Janeiro 2013.
 - Kalis, E. J. J., et al. (2007). Metal uptake by *Lolium Perenne* in contaminated soils using a four-step approach. *Environmental Toxicology and Chemistry* **26**: 335-345.
 - Kałuzna, J., et al. (2001). The assessment of the condition nourishing with an iron, zinc and copper of older persons living in Varsovian region on the basis of the hair analysis. *Roczn PZH* **52**(2): 111-118.

- Kment, P., et al. (2005). Differentiation of Czech wines using multielement composition – A comparison with vineyard soil. *Food Chemistry* **91**(1): 157-165.
- Komárek, M., et al. (2008). Copper contamination of vineyard soils from small wine producers: A case study from the Czech Republic. *Geoderma* **147**(1-2): 16-22.
- Koolman, J. and K. H. Roehm (2005). *Color Atlas of Biochemistry*. 2nd edition.
- Krauskopf, K. B. (1972). Geochemistry of micronutrients. In: *Micronutrients in agriculture*. Mortvedt, J.J.; Giordano, P.M.; Lindsay, W.L. Madison, Soil Science of America: 7-40.
- Krug, F., et al. (2004). *Espectrometria de Absorção Atômica Parte 1: Fundamentos e atomização com chama*.
- Krull, U. J., et al. *Encyclopedia of Physical Science and Technology - Analytical Chemistry*. 3rd edition.
- Lara, R., et al. (2005). Trace element determination of Argentine wines using ETAAS and USN-ICP-OES. *Food and Chemical Toxicology* **43**(2): 293-297.
- Lindon, J., et al. (2000). *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry. Volume 1*.
- Mackie, K. A., et al. (2012). Remediation of copper in vineyards--a mini review. *Environmental Pollution* **167**: 16-26.
- Marques, A. S., et al. (s/d). Infovini – Vinhos de Portugal. <http://www.infovini.com> Acedido em: Janeiro 2013.
- Mehra, R. and M. Juneja (2005). Fingernails as biological indices of metal exposure. *Journal of Biosciences* **30**(2): 253-257.
- Melaku, S., et al. (2005). Determination of trace elements in agricultural soil samples by inductively coupled plasma-mass spectrometry: Microwave acid digestion versus aqua regia extraction. *Analytica Chimica Acta* **543**(1-2): 117-123.
- Michalak, I., et al. (2012). Exposure to nickel by hair mineral analysis. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **34**(3): 727-734.
- Miekeley, N., et al. (1998). How reliable are human hair reference intervals for trace elements? *The Science of the Total Environment* **218**: 9-17.
- Mira de Orduña, R. (2010). Climate change associated effects on grape and wine quality and production. *Food Research International* **43**(7): 1844-1855.
- Moreno, I. M., et al. (2007). Differentiation of two Canary DO red wines according to

their metal content from inductively coupled plasma optical emission spectrometry and graphite furnace atomic absorption spectrometry by using Probabilistic Neural Networks. *Talanta* **72**(1): 263-268.

- Morton, J., et al. (2002). Removal of exogenously bound elements from human hair by various washing procedures and determination by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **455**: 23-34.
- Munakata, M., et al. (2006). A preliminary analysis of trace elements in the scalp hair of patients with severe motor disabilities receiving enteral nutrition. *Brain & Development* **28**(8): 521-525.
- Murray, R. W., et al. (2000). *Analysis of Major and Trace Elements in Rocks, Sediments and Interstitial Waters by Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry (ICP-AES)*.
- OIV (2011). *Maximum acceptable limits of various substances contained in wine*, Compendium of International Methods of Analysis - OIV.
- Olmedo, P., et al. (2010). Validation of a method to quantify chromium, cadmium, manganese, nickel and lead in human whole blood, urine, saliva and hair samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Anal Chim Acta* **659**(1-2): 60-67.
- Pais, I. and J. B. Jones Junior (1997). *The handbook of trace elements*, Boca Raton, St. Lucie Press, 223p.
- Pedro, J. (1991). *Carta da distribuição da Videira*. Ministério do Ambiente e Recursos Naturais. Lisboa.
- Pereira, E. (s/d). Breve História Geológica do NE de Trás-os-Montes (Paisagem Protegida da Albufeira do Azibo e Maciço de Morais). Universidade do Porto.
- PerkinElmer (2009). *Atomic Spectroscopy*. USA.
- Pinto, G. (2008). Iron deficiency: resistance or susceptibility against infections? *Revista Médica de Minas Gerais*. **18**(3): 191-196.
- Pires, A. (1963). *O concelho de Macedo de Cavaleiros*, Junta Distrital de Bragança.
- Pohl, P. (2007). What do metals tell us about wine? *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **26**(9): 941-949.
- Pozebon, D., et al. (1999). Análise de cabelo: uma revisão dos procedimentos para a determinação de elementos traço e aplicações. *Química Nova* **22**(6): 838-846.

- Pragst, F. and M. A. Balikova (2006). State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. *Clin Chim Acta* **370**(1-2): 17-49.
- Provenzano, M. R., et al. (2010). Copper contents in grapes and wines from a Mediterranean organic vineyard. *Food Chemistry* **122**(4): 1338-1343.
- Rao, K., et al. (2002). Determination of iron, cobalt, nickel, manganese, zinc, copper, cadmium and lead in human hair by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry *Spectrochimica Acta Part B* **57**: 1333-1338.
- Reichert, J. M. (2007). Fundamentos da Ciência do Solo. Universidade Federal de Santa Maria.
- Reimann, C. and P. Caritat (1998). Chemical Elements in the Environment - Factsheets for the Geochemist and Environmental Scientist. *Geological Magazine*. **137**(5): 596.
- Ribeiro, A. (1992). *Contribuição para o estudo da contaminação de solos por metais pesados*. Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre, Universidade Nova de Lisboa.
- Riganakosa, K. and P. Veltsistas (2003). Comparative spectrophotometric determination of the total iron content in various white and red Greek wines. *Food Chemistry* **82**: 637-643.
- Rodrigues, J. L., et al. (2008). Evaluation of the use of human hair for biomonitoring the deficiency of essential and exposure to toxic elements. *The Science of the Total Environment* **405**(1-3): 370-376.
- Rodrigues, S. M., et al. (2010). Evaluation of an approach for the characterization of reactive and available pools of twenty potentially toxic elements in soils: Part I I – Solid-solution partition relationships and ion activity in soil solutions. *Chemosphere* **81**: 1560-1570 (b).
- Rodushkin, I. and M. D. Axelsson (2000). Application of double focusing sector field ICP-MS for multielemental characterization of human hair and nails. Part II. A study of the inhabitants of northern Sweden. *The Science of the Total Environment* **262**: 21-36.
- Samanta, G., et al. (2004). Arsenic and other elements in hair, nails, and skin-scales of arsenic victims in West Bengal, India. *The Science of the Total Environment* **326**(1-3): 33-47.
- Santos, E. J. and E. Oliveira (2001). Determination of Mineral Nutrients and Toxic

Elements in Brazilian Soluble Coffee by ICP-AES. *Journal of Food Composition and Analysis* **14**: 523-531.

- Sardans, J., et al. (2010). Determination of As, Cd, Cu, Hg and Pb in biological samples by modern electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* **65**(2): 97-112.
- Sastre, J., et al. (2002). Determination of Cd, Cu, Pb and Zn in environmental samples: microwave-assisted total digestion versus aqua regia and nitric acid extraction. *Analytica Chimica Acta*. **462**: 59-72.
- Saurina, J. (2010). Characterization of wines using compositional profiles and chemometrics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **29**(3): 234-245.
- Schuhmacher, M., et al. (1994). Zinc and copper levels in serum and urine: relationship to biological habitual and environmental factors. *Science of the Total Environment* **148**: 67-72.
- Senofonte, O., et al. (2001). Hair analysis and the early detection of imbalances in trace elements for members of expeditions in Antarctica. *Microchemical Journal* **69**: 231-238.
- Senofonte, O., et al. (2000). Assessment of reference values for elements in human hair of urban schoolboys. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **14**: 6-13.
- Skoog, D. A., et al. (2000). *Principles of Instrumental Analysis*, Saunders College Publishing. 5th edition.
- Slotnick, M. J. and J. O. Nriagu (2006). Validity of human nails as a biomarker of arsenic and selenium exposure: A review. *Environmental Research* **102**(1): 125-139.
- Souza, M., et al. (2009). Heavy metals in cattle biological samples. *Ciência Rural* **39**(6): 1774-1780.
- Stafilov, T. and I. Karadjova (2009). Atomic Absorption Spectrometry in Wine Analysis – A Review. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering* **28**(1): 17-31.
- Štupar, J. and F. Dolinšek (1996). Determination of chromium, manganese, lead and cadmium in biological samples including hair using direct electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B* **51**: 665-683.
- Suhaj, M. and M. Koreňovská (2005). Application of Elemental Analysis for Identification Of Wine Origin. *Acta Alimentaria* **34**(4): 393-401.

- Sukumar, A. and R. Subramanian (2007). Relative element levels in the paired samples of scalp hair and fingernails of patients from New Delhi. *Sci Total Environ* **372**(2-3): 474-479.
- Thermo Elemental (2001). *AAS, GFAAS, ICP or ICP-MS? Which technique should I use? An elementary overview of elemental analysis*. USA.
- Toyokuni, S. (2009). Role of iron in carcinogenesis: cancer as a ferrotoxic disease. *Cancer Sci* **100**(1): 9-16.
- UNICAM *Manual de operações do equipamento “UNICAM 701 Series ICP Systems”*.
- Villiers, A., et al. (2012). Analytical techniques for wine analysis: an African perspective; a review. *Anal Chim Acta* **730**: 2-23.
- Voica, C., et al. (2009). Method validation for determination of heavy metals in wine and slightly alcoholic beverages by ICP-MS. *Journal of Physics: Conference Series* **182**: 012036.
- Walters, K. A., et al. (2012). The human nail - Barrier characterisation and permeation enhancement. *Int J Pharm* **435**(1): 10-21.

CAPÍTULO 6 - ANEXOS

Anexo I - Questionário aplicado aos inquiridos deste estudo.

Nº _____

Universidade de Coimbra
Faculdade de Ciências e Tecnologia
Mestrado em Química Forense

QUESTIONÁRIO

Este questionário destina-se à recolha de elementos para a realização do projeto científico do Mestrado em Química Forense. As suas respostas sinceras são fundamentais para o sucesso deste estudo.

1. Sexo:

FEMININO

MASCULINO

2. Idade: _____

3. Qual é o seu peso? _____

4. Qual é a sua altura? _____

5. Qual é a sua profissão? _____

6. Costuma pintar o cabelo?

SIM NÃO

7. Que marca de champô utiliza? _____

8. Costuma pintar as unhas?

SIM NÃO

9. Fuma?

SIM NÃO

10. Tem alguma doença?

SIM NÃO

10.1. Se sim, qual? _____

11. Toma medicamentos?

SIM NÃO

11.1. Se sim, qual ou quais?

12. Costuma beber vinho?

SIM NÃO

12.1. Se sim, com que frequência bebe vinho?

1 vez por dia

2 ou mais vezes por dia

1 vez por semana Outra Qual? _____

12.2. Bebe regularmente o mesmo vinho?

SIM NÃO

12.3. Que quantidade bebe de cada vez? _____

12.4. Desde que idade bebe vinho? _____

12.5 Tem vinha?

SIM NÃO

12.6. Se sim, consome vinho da própria vinha?

SIM NÃO

12.7. Em que local se situa a vinha? _____

12.8. Que tipo de tratamento faz à vinha?

Lavragem Adubagem

Estrumagem Tratamento com pesticidas

Outro Qual? _____

13. De onde provém a água que bebe?

Água engarrafada

Água da fonte

Água da torneira

Outra Qual? _____

13.1. No caso de beber água engarrafada que marca(as) de água costuma beber?

14. Consome produtos alimentares que cultiva?

SIM

NÃO

14.1. Se sim, que tipo de produtos alimentares? _____

14.2. Se sim, os produtos alimentares que consome são cultivados na vinha?

SIM

NÃO

OBRIGADA PELA COLABORAÇÃO!

Anexo II - pH das amostras de solo e temperatura das amostras aquando da leitura do pH.

Amostras de solo	Profundidade (cm)	pH
2	0	7,2
	40	7,5
7	0	6,0
	40	5,5
9	0	4,7
	40	4,0
10	0	4,4
	40	4,4
12	0	4,6
	40	4,8
13	0	4,7
	40	4,4
14	0	5,2
	40	5,5
15	0	4,4
	40	4,8
16	0	6,3
	40	6,3
17	0	6,0
	40	4,1
18	0	5,1
	40	4,7
19	0	4,9
	40	5,7
20	0	5,7
	40	5,0
21	0	8,1
	40	8,0

22	0	6,4
	40	6,4
23	0	4,6
	40	4,5
24	0	8,0
	40	7,5
25	0	5,0
	40	4,8
26	0	5,6
	40	4,7
27	0	5,5
	40	5,1
28	0	5,2
	40	4,9

Anexo III - Percentagens de matéria seca determinada para as amostras de solo e massas de solo a pesar para o digestor para efetuar a digestão no micro-ondas.

Amostra	Profundidade (cm)	% Matéria seca	Massa de solo a pesar (g)
2	0	90,9	1,1001
	40	87,9	1,1377
7	0	84,2	1,1876
	40	85,2	1,1737
9	0	94,0	1,0638
	40	92,4	1,0823
10	0	94,4	1,0593
	40	91,4	1,0941
12	0	86,8	1,1521
	40	88,1	1,1351
13	0	86,2	1,1601
	40	87,2	1,1468
14	0	84,3	1,1862
	40	85,7	1,1669
15	0	71,8	1,3928
	40	86,2	1,1601
16	0	80,7	1,2392
	40	82,9	1,2063
17	0	85,8	1,1655
	40	89,1	1,1223
18	0	85,4	1,1710
	40	86,3	1,1587
19	0	86,1	1,1614
	40	87,2	1,1468

20	0	86,7	1,1534
	40	86,0	1,1628
21	0	86,3	1,1587
	40	88,3	1,1325
22	0	86,8	1,1521
	40	86,8	1,1521
23	0	88,7	1,1274
	40	71,2	1,4045
24	0	70,3	1,4225
	40	78,1	1,2804
25	0	93,0	1,0753
	40	95,4	1,0482
26	0	87,1	1,1481
	40	84,8	1,1792
27	0	86,4	1,1574
	40	85,8	1,1655
28	0	87,6	1,1416
	40	86,9	1,1507

Anexo IV - Massa das amostras de cabelo utilizadas na digestão.

Amostra	Massa de cabelo (g)
2	0,5435
4	0,5350
6	0,5618

Anexo V - Massa das amostras de unhas utilizadas na digestão.

Amostra	Massa de unhas (g)
2	0,3525
3	0,3083
4	0,1361
6	0,3813
9	0,2842
10	0,6843
13	0,1761
14	0,1393
16	0,3525
17	0,2519
18	0,2368
19	0,1402
20	0,1351
21	0,1479
22	0,1800
24	0,2841
25	0,1442
27	0,0988
28	0,2929
29	0,1427
31	0,2692
32	0,1210

33	0,3113
35	0,2399
36	0,1315
38	0,2048
39	0,1374
40	0,1705
41	0,2104
44	0,1594
46	0,1655

Anexo VI - Limites de deteção para os métodos utilizados e limites de deteção determinados para as amostras de solo, vinho, cabelo e unhas.

Elementos	LD método	LD solo	LD vinho	LD cabelo	LD unhas
Cu (ICP-AES)	5 µg/L	0,5 mg/Kg	0,125 mg/L	0,2 µg/g	0,25 µg/g
Fe (ICP-AES)	5 µg/L	0,5 mg/Kg	0,125 mg/L	0,2 µg/g	0,25 µg/g
Zn (ICP-AES)	3 µg/L	0,3 mg/Kg	0,075 mg/L	0,12 µg/g	0,15 µg/g
Ni (ICP-AES)	33 µg/L	-----	-----	-----	1,65 µg/g
Ni (GFAAS)	0,7 µg/L	0,07 mg/Kg	0,014 mg/L	0,028 µg/g	-----

Anexo VII - Limites de quantificação para os métodos utilizados e limites de quantificação determinados para as amostras de solo, vinho, urina, cabelo e unhas.

Elementos	LQ método	LQ solo	LQ vinho	LQ cabelo	LQ unhas	LQ urina
Cu (ICP-AES)	20 µg/L	2,0 mg/Kg	0,5 mg/L	0,8 µg/g	1 µg/g	-----
Fe (ICP-AES)	20 µg/L	2,0 mg/Kg	0,5 mg/L	0,8 µg/g	1 µg/g	-----
Zn (ICP-AES)	20 µg/L	2,0 mg/Kg	0,5 mg/L	0,8 µg/g	1 µg/g	-----
Ni (ICP-AES)	100 µg/L	-----	-----	-----	5 µg/g	-----
Ni (GFAAS)	5 µg/L	0,5 mg/Kg	0,1 mg/L	0,2 µg/g	-----	-----
Cu (FAAS)	200 µg/L	-----	-----	-----	-----	400 µg/L
Fe (FAAS)	200 µg/L	-----	-----	-----	-----	400 µg/L
Zn (FAAS)	200 µg/L	-----	-----	-----	-----	400 µg/L