

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais



**EMBALAGENS METÁLICAS E ALIMENTOS:
O CASO DO ATUM ENLATADO**

Liana Appel Bouffleur Niekraszewicz

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre, junho de 2010.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais

EMBALAGENS METÁLICAS E ALIMENTOS: O CASO DO ATUM ENLATADO

Liana Appel Bouffleur Niekraszewicz

Dissertação realizada sob a orientação do Prof. Dr. Livio Amaral e co-orientação do Prof. Dr. Johnny Ferraz Dias, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em preenchimento parcial dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência dos Materiais.

Porto Alegre

2010

* Trabalho financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Aos que completam a minha vida.

“Sem sonhos, as perdas se tornam insuportáveis, as pedras do caminho se tornam montanhas, os fracassos se transformam em golpes fatais.

Mas se você tiver grandes sonhos...

Seus erros produzirão crescimento, seus desafios produzirão oportunidades, seus medos produzirão coragem.”

Augusto Cury

AGRADECIMENTOS

Aos Drs. Livio Amaral e Johnny Ferraz Dias, pela orientação, atenção, amizade e paciência.

Aos amigos e colegas do grupo PIXE, Carla, Rafaela, Douglas, Masahiro e Cláudia pelo apoio e companheirismo.

Aos técnicos do Laboratório de Implantação Iônica, Borba, Miro e Péco e ao Eng. Agostinho, pela constante disposição e competência.

A Pró-Reitoria de Pesquisa da UFRGS pelo auxílio financeiro para participação em eventos onde apresentei os resultados deste trabalho.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciência dos Materiais – UFRGS, pela oportunidade de realizar este mestrado.

A CAPES pela concessão de bolsa de mestrado.

Aos meus pais Fernando e Ellen e a minha irmã Luma, pelo amor, incentivo e apoio sem limites.

Ao meu marido, Leonardo, pela paciência, companheirismo e carinho, sempre.

A todas as demais pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

PARTICIPAÇÃO EM ARTIGOS

Dias, J.F.; Fernandez, W.S.; Bouffleur, L.A.; Santos, C.E.I. dos; Amaral, L.; Yoneama, M.L.; Dias, J.F.; *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B*, **Biomonitoring study of seasonal anthropogenic influence at the Itamambuca beach (SP, Brazil)**, 2009, 267, p. 1960-1964. doi:10.1016/j.nimb.2009.03.100

Santos, C.E.I dos; Silva, L.R.M da; Bouffleur, L.A.; Debastini, R.; Stefenon, C.A.; Amaral, L.; Yoneama, M.L.; Dias, J.F.; *Food Chemistry*, **Elemental characterization of Cabernet Sauvignon wines using Particle-Induced X-ray Emission (PIXE)**, 2010, 121, p. 244-250. doi:10.1016/j.foodchem.2009.11.079

APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS

IV Encontro Sul-Americano de Colisões inelásticas na Matéria, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, 29 a 31 de outubro de 2008. Apresentação de pôster e publicação no livro de resumos. Trabalho: *Aplicação da técnica PIXE ao estudo de poluição de regiões costeiras marinhas utilizando peixes como bioindicadores.*

19th International Conference on Ion Beam Analysis, 7 a 11 de setembro de 2009, University of Cambridge, UK. Apresentação de pôster e publicação no livro de resumos. Trabalho: *Elemental Concentration of Canned Tuna Fish.*

XVI Congresso Brasileiro de Toxicologia e IV Simpósio Brasileiro sobre Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos, Belo Horizonte, MG, Minascentro, 10 a 14 de outubro de 2009. Apresentação de pôster e publicação no livro de resumos. Trabalho: *Elemental Concentration of Canned Tuna Fish.*

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1 Organização do Trabalho	2
2. Revisão Bibliográfica	3
2.1 Consumo de Peixes, Metais Pesados e Regulamentação	3
2.2 Embalagens Metálicas	6
2.3 Caracterização Elementar	7
3. Descrição Experimental	8
3.1 Amostras	8
3.1.1 Características	8
3.1.2 Preparação	9
3.2 Técnicas e Equipamentos	11
3.2.1 Detalhes do Equipamento	11
3.2.2 PIXE - Detecção dos Raios-X Característicos	13
4. Resultados e Discussão	14
4.1 Caracterização da Matriz com RBS	14
4.2 Determinação dos Elementos Traço com PIXE	15
4.2.1 Comparativo das Camadas de Atum Enlatado	19
4.2.2 Comparativo das Paredes Internas das Embalagens	20
4.2.3 Comparativo das Conservas: Água X Óleo.....	22
4.2.4 Análises Temporais	23
4.2.5 Comparativo entre Atum Enlatado, em Sachê e Fresco	28
4.2.6 Análise dos Demais Elementos	29
5. Conclusões	32
6. Técnicas Analíticas com Feixes de Íons	34
6.1 Espectrometria de Retroespalhamento Rutherford	35
6.1.1 Introdução	35
6.1.2 Princípios Básicos	35
6.1.3 Interpretação do Sinal	36
6.1.3.1 Ajuste com SIMNRA	38
6.2 Emissão de Raios-X Induzida por Partículas	39
6.2.1 Breve Histórico.....	39

6.2.2 Características Gerais da Técnica	41
6.2.3 Princípios Básicos	41
6.2.4 Radiação de Fundo	43
6.2.5 Relação entre Intensidades de Raios-X e Concentrações	44
6.2.7 Quantificação - Padronização.....	46
6.2.7.1 Análises com GUPIXWIN	47
6.2.8 Acurácia	50
6.2.9 Limites de Detecção	50
Referências Bibliográficas	53

RESUMO

Desde seu surgimento no século 19, alimentos enlatados e processos de enlatamento evoluíram a fim de suprir a demanda por alimentos não-perecíveis. Em termos de consumo mundial, atum enlatado é uma das escolhas mais populares quando se trata de peixes.

Nos últimos anos, o atum enlatado se tornou uma fonte importante de proteínas, vitamina D e ácidos graxos essenciais. Por outro lado, as altas concentrações de metais pesados encontradas no atum têm gerado dúvidas quanto aos benefícios de uma dieta rica nesse peixe.

O objetivo deste trabalho é estudar a concentração elementar de atum enlatado e avaliar se existe alguma interação entre a lata e o alimento. Para este fim, a técnica Particle-Induced X-ray Emission (PIXE) foi empregada para estudar diferentes marcas de atum enlatado comercializado no mercado local.

A análise dos resultados revela que a concentração do atum é homogênea dentro da lata. Os principais elementos presentes no atum são Na, S, Cl, K, Ca e Fe. Alguns elementos como o Al, Cu, Ti, Pb e Hg foram observados em algumas amostras em concentrações compatíveis com o limite de detecção do sistema. Nossos resultados sugerem que não há interferência entre a lata e o peixe em conserva. Os níveis de Pb e Hg encontrados estão abaixo dos limites estabelecidos pelas agências reguladoras de saúde.

ABSTRACT

Since its first appearance in the 19th century, canned food and canning processes have evolved in order to supply an ever increasing demand for non-perishable food. In terms of worldwide consumption, canned tuna is one of the most popular choices as far as fish is concerned.

In the last years canned tuna has become an important dietary source of proteins, vitamin D and omega-3 fatty acids. On the other hand, high concentrations of heavy metals found in tuna fish have raised concerns about the benefits of a diet rich in this fish.

The aim of this work is to study the elemental concentration of canned tuna and assess whether the canister has any influence on the food itself. To that end the Particle-Induced X-ray Emission (PIXE) technique was employed to study different brands of canned tuna purchased at the local market.

The data analysis reveals that the elemental concentration of tuna fish is homogeneous throughout each canister. The major elements of tuna fish are Na, S, Cl, K, Ca and Fe. Low concentrations of Al, Cu, Ti, Pb and Hg were found in few samples only. Our results suggest that there is no interference between the canister and the tuna fish preserved in it. The levels of Pb and Hg are found to be below the limits set by regulatory agencies of health.

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

A alimentação é o fator que mais influencia a qualidade de vida do ser humano. Tendo em vista a crescente preocupação da população com a saúde e a busca por uma boa alimentação, a qualidade dos alimentos tem sido um dos principais focos de estudo em todo o mundo.

Hoje em dia existem diversas organizações que regulamentam a qualidade e integridade dos alimentos disponíveis à população. Essas organizações determinam valores de referência para certos elementos considerados tóxicos (p.ex.: Cd, Hg, Pb)¹ que devem ser respeitados de forma a garantir a saúde e o bem estar dos consumidores.

Além dos aspectos nutricionais, a qualidade dos alimentos depende diretamente dos processos de produção, manufatura, acondicionamento, transporte e armazenamento. Nestas etapas, o desenvolvimento científico e tecnológico é constante na busca por processos que otimizem a produção, aumentem a vida útil do produto, reduzam os custos e que, ao mesmo tempo, garantam o sabor, a qualidade e os benefícios destes alimentos.

A evolução das embalagens é destaque no ramo dos alimentos. A ampla utilização de embalagens metálicas no acondicionamento de produtos alimentícios deve-se às suas características de impermeabilidade, hermeticidade, baixo peso, facilidade de moldagem e resistências mecânica e térmica.

Em contrapartida, o monitoramento destas embalagens é necessário a fim de verificar possíveis interações dos materiais que compõem as embalagens e os alimentos acondicionados nas mesmas. Estas interações podem resultar em contaminação e reações toxicológicas nocivas aos consumidores.

Neste contexto, este estudo visa determinar a composição elementar do atum enlatado e de sua respectiva embalagem, bem como verificar se existe alguma migração de elementos presentes nestas embalagens metálicas para o conteúdo. Através dos resultados obtidos, esperamos adicionar informações a respeito da constituição elementar do atum enlatado e de suas embalagens e, de algum modo, contribuir para novas pesquisas na área de alimentos e materiais.

1.1 ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO

Esta dissertação de mestrado está organizada em cinco capítulos, além desta introdução.

No capítulo 2 apresentamos uma revisão bibliográfica dos assuntos abordados neste estudo, tais como, alimentação e qualidade de vida, consumo de peixes, toxicologia e regulamentação, estudo de alimentos enlatados, métodos e técnicas, e aplicação da técnica PIXE no estudo de alimentos e amostras orgânicas.

Os procedimentos experimentais são descritos no capítulo 3. É feito o detalhamento da preparação de amostras, dos parâmetros experimentais, da obtenção dos espectros e do tratamento de dados. Este capítulo contém, adicionalmente, informações sobre o equipamento e seus principais componentes.

No capítulo 4 apresentamos, em detalhes, os resultados qualitativos e quantitativos acompanhados de uma discussão direta e comparativa com outros trabalhos publicados sobre este assunto. Complementarmente, o capítulo 5 reúne as conclusões relacionadas aos dados apresentados.

O capítulo 6 é composto por dois anexos onde estão descritas, de maneira mais aprofundada, as técnicas analíticas utilizadas para a caracterização das amostras deste estudo.

Capítulo 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

*“Deixe que a alimentação seja o seu remédio e o remédio a sua alimentação”
(Hipócrates)*

2.1 CONSUMO DE PEIXES, METAIS PESADOS E REGULAMENTAÇÃO

Quando se fala em saúde e bem estar, o fator de maior relevância é a alimentação. A preocupação crescente em relação à qualidade dos alimentos tem impulsionado pesquisas em diversas áreas de conhecimento em todo o mundo.

De acordo com o *GUIA ALIMENTAR PARA A POPULAÇÃO BRASILEIRA*², desenvolvido pelo Ministério da Saúde, uma alimentação saudável deve conter água, carboidratos, proteínas, lipídios, vitaminas, fibras e minerais, os quais são insubstituíveis e indispensáveis ao bom funcionamento do organismo.

Segundo o guia,

“A ciência comprova aquilo que ao longo do tempo a sabedoria popular e alguns estudiosos, há séculos, apregoavam: a alimentação saudável é a base para a saúde. A natureza e a qualidade daquilo que se come e se bebe é de importância fundamental para a saúde e para as possibilidades de se desfrutar todas as fases da vida de forma produtiva e ativa, longa e saudável”.

Na classe das proteínas, o consumo de peixes é altamente recomendado por apresentar baixo teor de gordura em relação à carne vermelha e alimentos embutidos. Peixes são considerados alimentos de alta qualidade por serem fontes de proteínas ricas em aminoácidos essenciais, micro e macro elementos (Ca, P, F), gorduras que são fontes valiosas de energia, vitaminas, e ácidos graxos insaturados essenciais (ômega-3) que estão associados com a redução do risco de doenças cardiovasculares, de alguns tipos de câncer e auxiliares no tratamento de doenças inflamatórias como a artrite reumatóide.

Por outro lado, diversos estudos mostram que a inclusão de certos peixes na dieta pode aumentar o risco de exposição à contaminantes químicos. Isto se dá pelo fato destes peixes estarem diretamente expostos à poluição aquática e, conseqüentemente, acumularem em seus

tecidos estes contaminantes, principalmente metais pesados. Esta última característica dos peixes é utilizada, por exemplo, para biomonitoramento de poluição ambiental^{3,4}.

Dentre os metais pesados, mercúrio é o elemento mais citado nas pesquisas, pois se sabe que uma dieta rica em peixes é a fonte primária de contaminação por mercúrio no homem, seguida pela exposição ocupacional⁵. O mercúrio encontrado nos peixes é advindo principalmente da poluição atmosférica. Presente no ar, este metal se deposita na água, circula no ambiente aquático e transforma-se em metil-mercúrio. Este composto acumula-se nos tecidos dos peixes e ali permanece, por não ter função biológica. Quando estes peixes são consumidos pelos seres humanos, o metil-mercúrio é absorvido e se acumula nos rins, no fígado e no sistema nervoso central, podendo causar sérios problemas de saúde como, ataxia (perda da coordenação dos movimentos voluntários), disartria (problemas nas articulações das palavras), parestesia (perda de sensibilidade nas extremidades das mãos e pés, e ao redor da boca), visão de túnel (constricção do campo visual) e perda da audição. Uma contaminação severa pode causar cegueira, coma e morte⁶.

A presença de Hg nos peixes e seus efeitos tóxicos têm sido estudados desde os anos 70^{7, 8}. Traços de Pb, As, Cd e Sn também são investigados por diversos pesquisadores, pois também apresentam perigos à saúde⁹. O chumbo é outro elemento que deve ser monitorado, pois, assim como o mercúrio, não tem função biológica no organismo e qualquer quantidade presente é considerada tóxica. Este elemento, quando absorvido, atinge o sistema nervoso central e periférico. Como principais sintomas de intoxicação por chumbo, pode-se citar: anemia, déficit de aprendizado e de desenvolvimento neurocomportamental.

Agências e organizações tais como United States Food and Drug Administration (US-FDA)¹⁰, Food and Agriculture Organization (FAO)¹¹ e World Health Organization (WHO)¹² fornecem orientações sobre a ingestão de elementos pesados. A US-FDA recomenda um consumo diário de referência (RDI – Reference Daily Intake) com valores para alguns elementos presentes nos alimentos. A FAO recomenda ingestões semanais toleráveis permissíveis (PTWIs – Permissible Tolerable Weekly Intake) e ingestões diárias aceitáveis (ADI – Acceptable Daily Intake) de aditivos alimentares e certos contaminantes presentes nos alimentos. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da Portaria nº 685, de 27 de agosto de 1998, estipula uma listagem com limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos (As, Cu, Sn, Pb, Cd e Hg)¹³ nos alimentos (Tabela 1).

Tabela 1: Limites estabelecidos para os contaminantes nos alimentos. A ANVISA determina a quantidade (mg/kg) de cada elemento que um produto alimentício pode conter, enquanto que a FAO determina as quantidades relativas à ingestão semanal permitida em função de cada quilo de peso corpóreo do consumidor (mg/kg bw – body weight). A última coluna desta tabela simula a ingestão semanal permitida para uma pessoa de 65kg.

Elemento	Limites de concentração	Limites de ingestão	
	ANVISA(mg/kg)	FAO (mg/kg bw)	Simulação (mg/65kg)
As	1,0	0,015	0,975
Cu	-	0,05 - 0,5	3,25 - 32,5
Cd	1,0	0,007	0,455
Sn	-	14	910
Hg	1,0	0,005	0,325
Pb	2,0	0,025	1,625

A partir das informações fornecidas por estas agências é possível determinar se um alimento é seguro para o consumo humano ou não. No caso de alimentos que não devem ser excluídos da dieta (p.ex. os peixes) e que apresentam traços de contaminantes, pode-se determinar as quantidades seguras de ingestão, minimizando o acúmulo destes contaminantes no organismo.

Dentre os peixes que fazem parte da alimentação humana, o atum se destaca por ser uma das espécies mais consumidas, principalmente na forma enlatada. Por outro lado, esta espécie é alvo de estudos, pois pode concentrar maior quantidade de metais pesados em consequência de seu comportamento predatório.

Existem inúmeras publicações a respeito da contaminação de atuns por metais pesados. Deve-se ressaltar que os resultados contidos na literatura são representativos de cada região de coleta e não podem ser tomados como regra geral, pois a concentração elementar destes peixes depende diretamente do ecossistema em que habitam. Por este motivo, existem diversos estudos envolvendo este mesmo tema em diferentes países, como Estados Unidos¹⁴, Líbia¹⁵, Turquia¹⁶ e Irã¹⁷ dentre outros.

Usydus¹⁸ e colaboradores estudaram a relação entre os riscos e benefícios do consumo de peixes enlatados comercializados no mercado polonês. Diversas variedades de peixes enlatados foram estudadas e os conteúdos de substâncias nutritivas e de contaminantes foram determinados. Os resultados contidos em tal estudo mostram que traços de metais pesados estão presentes, mas em quantidades abaixo dos limites estabelecidos pelas agências de regulamentação, concluindo que os benefícios nutricionais do consumo de peixes compensam os riscos.

Ho¹⁹ e colaboradores em 2009 estudaram um caso descrevendo uma intoxicação por Hg devido ao consumo diário de atum enlatado. O paciente desenvolveu amnésia dissociativa e o diagnóstico médico constatou que os níveis de Hg na corrente sanguínea estavam acima do normal. Um tratamento para a redução da quantidade de Hg no sangue foi realizado e o paciente evoluiu de maneira positiva, recuperando a memória gradualmente.

Yallouz²⁰ e colaboradores determinaram os níveis de mercúrio em atum sólido enlatado comercializado na cidade do Rio de Janeiro, Brasil. Os resultados apresentados mostram que 53% das amostras apresentam um teor de Hg superior ao máximo recomendado, sugerindo que existe a necessidade de maior controle de qualidade destes alimentos.

2.2 EMBALAGENS METÁLICAS

Além dos aspectos nutricionais, a qualidade dos alimentos depende diretamente dos processos de produção e armazenamento. A qualidade das embalagens é um fator relevante quando se trata de alimentação e saúde. Segundo o Centro de Tecnologia da Embalagem (CETEA)²¹, a ampla utilização de embalagens metálicas no acondicionamento de produtos alimentícios deve-se às suas características de impermeabilidade, hermeticidade, baixo peso e facilidade de moldagem. No ramo dos alimentos termoprocessados, destacam-se as resistências mecânica e térmica.

Os avanços tecnológicos na área de materiais têm permitido a utilização de folhas de menor espessura e de materiais alternativos na produção das latas, gerando redução nos custos. Os costumes contemporâneos foram satisfeitos pelo desenvolvimento de tampas de fácil abertura, de novos designs de latas, e pela disponibilidade de alimentos enlatados em porções individuais. Além disso, estas embalagens são 100% recicláveis contribuindo para a preservação do meio ambiente. Apesar dessas características, não é descartada a possibilidade de reação química entre os elementos presentes na lata e o alimento contido nela durante o período de armazenamento. Estudos sobre os efeitos do processo de enlatamento e

armazenamento de atum foram apresentados por Rasmussen²² e Ganjavi²³. O primeiro mostra que a quantidade de Hg no atum enlatado não varia durante o processo de enlatamento. O segundo, por sua vez, mostra que os processos de descongelamento, cozimento e esterilização reduzem os conteúdos de Pb e Cd.

2.3 CARACTERIZAÇÃO ELEMENTAR

Para determinar os elementos contidos no atum e em suas respectivas embalagens, pode-se contar com uma diversidade de técnicas. Dentre estas, destacam-se todas as técnicas baseadas na espectrometria de absorção atômica via excitação por plasma (ICP-based techniques) e DMA (Direct Mercury Analyzer). Estas técnicas são capazes de determinar quantidades traço de elementos nas amostras. Entretanto, a preparação das amostras inclui processos de diluição e adição de outros elementos. Além disso, não é possível realizar a determinação simultânea de vários elementos.

A técnica PIXE (Particle-Induced X-ray Emission)²⁴ oferece grande vantagem neste ponto. A preparação das amostras é, em geral, simples. Basta que estas sejam sólidas, homogêneas e planas. Em uma única medida, é possível determinar todos os elementos presentes na amostra ($Z > 11$) com limite de detecção da ordem de partes por milhão (ppm).

Saitoh²⁵ e colaboradores realizaram um estudo comparativo entre quantidades elementares determinadas com PIXE e com ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) e/ou ICP-AES (Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectrometry) para amostras de padrões NIST (National Institute of Standards and Technology, USA). Este estudo indica que PIXE é uma técnica eficiente e pode ser utilizada para analisar com precisão muitos elementos, tornando-se um dos meios mais efetivos de análise em estudos ambientais.

Diversos estudos envolvendo amostras orgânicas, desde alimentos até tecidos celulares, já utilizam esta técnica. Para exemplificar, pode-se citar alguns trabalhos tais como a caracterização elementar da erva-mate (*Ilex paraguariensis*)²⁶ e dos vinhos gaúchos²⁷, estudos de poluição via bioindicadores^{2,3}, determinação de níveis de ferro no cultivo de arroz²⁸, além de caracterização de amostras de sangue, ossos, unhas e cabelos, onde a composição elementar serve como ferramenta de diagnóstico de incorporação de metais²⁴.

Desta forma, associar PIXE à investigação da composição elementar de alimentos enlatados é, no nosso conhecimento, um trabalho pioneiro no Brasil, cuja motivação está relacionada a uma questão de tecnologia, saúde e qualidade de vida.

Capítulo 3

DESCRIÇÃO EXPERIMENTAL

3.1 AMOSTRAS

3.1.1 Características

As amostras utilizadas neste estudo foram adquiridas no mercado local da cidade de Porto Alegre, RS, Brasil. As variáveis das amostras de atum industrializado são basicamente: marca, embalagem, tipo de conserva e data de fabricação (Tabela 2). Para complementar este estudo, utilizamos amostras de atum cru, fresco, sem qualquer tipo de conserva ou tempero.

Tabela 2: Identificação e detalhes das amostras de atum utilizadas nesta pesquisa.

Identificação	Marca	Embalagem	Fabricação	Conserva
1	G	lata	17/12/2006	água e sal
2	G	lata	6/8/2007	água e sal
3	G	lata	6/8/2007	água e sal
4	P	lata	31/7/2006	água e sal
5	P	lata	24/1/2007	água e sal
6	P	lata	24/1/2007	água e sal
7	P	lata	12/6/2007	água e sal
8	P	lata	12/6/2007	água e sal
9	C	lata	3/3/2006	água e sal
10	C	lata	30/6/2006	óleo
11	C	lata	23/10/2006	óleo
12	C	lata	30/11/2006	óleo
13	C	lata	30/11/2006	óleo
14	C	lata	30/11/2006	óleo
15	C	lata	23/4/2007	óleo
16	C	lata	23/4/2007	óleo
17	C	lata	2/5/2007	óleo
18	C	lata	7/5/2007	água e sal
19	C	lata	7/5/2007	água e sal
20	C	sachê	31/5/2006	óleo
21	C	sachê	31/5/2006	óleo
22	#	fresco	19/11/2008	#
23	#	fresco	24/11/2008	#

De acordo com as informações fornecidas pelos fabricantes das três marcas que aparecem na tabela 2, as espécies enlatadas podem variar de acordo com a época em que é realizada a pesca dos peixes. A tabela 3 indica as diversas espécies utilizadas em cada uma.

Tabela 3: Espécies de atum utilizadas pelos fabricantes das três marcas estudadas.

<i>Marca</i>	<i>Espécies</i>
G	<i>Skip Jack, Yellowfin</i>
P	<i>Katsuwonus pelamis, Thunnus alalunga, Thunnus albacares, Thunnus atlanticus, Thunnus obesus, Thunnus maccoyii, Thunnus thynnus, Thunnus tonggol</i>
C	<i>Skip Jack, Yellow tuna, Bigeye tuna</i>

3.1.2 Preparação

As amostras de atum enlatado foram preparadas de acordo com as seguintes etapas:

1. Higienização das embalagens ainda fechadas.
2. Abertura e drenagem do conteúdo líquido (conserva).
3. Separação do conteúdo sólido em três partes (Figura 1a), denominadas como segue:
 - **Superior:** camada de atum em contato com a parede interna da tampa da lata;
 - **Intermediária:** camada em contato mínimo com a lata;
 - **Inferior:** camada em contato com a parede interna do fundo da lata.
4. Secagem: os conteúdos foram colocados em placas de petri e levados ao forno convencional a uma temperatura de 70°C, durante aproximadamente 2 horas.
5. Homogeneização: as amostras foram maceradas até formarem um pó fino.
6. Pastilhamento: o pó fino foi transformado em uma pastilha com auxílio de uma prensa hidráulica e de uma fôrma de aço temperado, resultando em amostras com 25 mm de diâmetro, 2 mm de espessura e peso médio de 1,5 g.

As latas vazias foram higienizadas para a confecção das amostras da embalagem.

Foram feitas amostras das paredes metálicas internas das latas (Figura 1b). Estas paredes foram recortadas em círculos com o mesmo diâmetro das pastilhas de atum acima descritas.

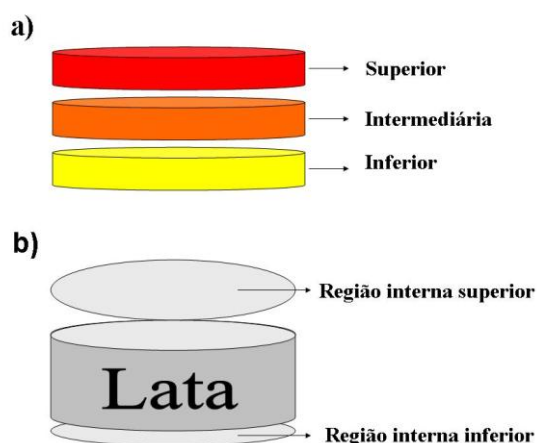


Figura 1: Esquema representativo da separação do conteúdo das latas (a) e regiões de análise das embalagens (b).

Os conteúdos de atum em sachê não foram separados em diferentes camadas, pois praticamente todo o conteúdo estava em contato com a embalagem. Exceto isso, o método de preparação foi o mesmo descrito para o atum enlatado.

As postas de atum fresco foram cortadas em pequenos pedaços e posteriormente levadas ao forno, homogeneizadas e pastilhadas.

O número de pastilhas confeccionadas para cada amostra variou de acordo com a quantidade de amostra disponível. A tabela 4 apresenta o número de pastilhas produzidas para cada uma das 23 amostras listadas anteriormente.

Tabela 4: Número de pastilhas produzidas para cada uma das amostras.

<i>Amostra</i>	<i>Nº amostras</i>	<i>Nº pastilhas/amostra</i>	<i>Total</i>
Atum enlatado	19	8 → $\begin{pmatrix} 2 \text{ superiores} \\ 3 \text{ intermediárias} \\ 3 \text{ inferiores} \end{pmatrix}$	152
Latas	19	2 → $\begin{pmatrix} 1 \text{ tampa} \\ 1 \text{ fundo} \end{pmatrix}$	38
Atum em sachê	2	5	5
Sachê	2	3	3
Atum fresco	2	5	10
Total de pastilhas: 208			

3.2 TÉCNICAS E EQUIPAMENTOS

As amostras foram caracterizadas com auxílio das técnicas PIXE e RBS (Rutherford Backscattering Spectrometry)²⁹. A técnica RBS foi utilizada para determinar a concentração dos elementos leves que compõem a matriz da amostra, ou seja, aproximadamente 98% sua massa total. A técnica PIXE, por sua vez, foi utilizada para a determinação da concentração de elementos traço que compõem o restante da amostra. Os princípios básicos e a física envolvida nestas duas técnicas são descritos com mais detalhe no capítulo 6.

3.2.1 Detalhes do Equipamento

Os experimentos de PIXE e RBS foram realizados utilizando um acelerador tipo tandem com tensão terminal de 3MV (Figura 2a).

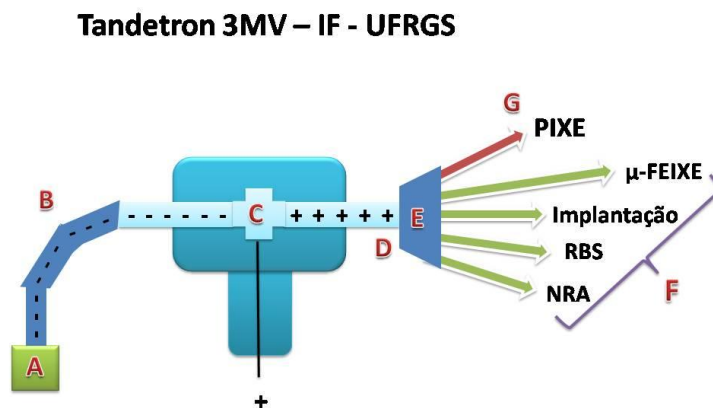


Figura 2a: Ilustração do equipamento com seus principais componentes.

Primeiramente a fonte de íons (A) gera íons H^- que são injetados no acelerador por um sistema de magnetos e fendas mecânicas ajustáveis (B), que seleciona os íons de acordo com suas massas e os direciona até o terminal positivo do acelerador. Neste terminal (C) os íons perdem seus elétrons em um *stripper* gasoso de N_2 , tornando-se íons H^+ . Estes íons, agora positivos, são repelidos pelo terminal positivo até o último terminal do acelerador (D).

Ao final, após a aceleração, um sistema de deflexão e focalização de partículas carregadas (E) direciona os íons para uma das linhas de análise (F,G).

No caso de PIXE, o feixe de íons é dirigido à câmara de reações, que opera em vácuo com pressão da ordem de 10^{-6} milibar, gerado por uma bomba de vácuo turbomolecular.

Conectada à câmara de reações, está a pré-câmara, onde o suporte de amostras é montado. Esta pré-câmara é fundamental, pois permite a troca de amostras sem a interrupção do vácuo na câmara principal.

No caso de amostras isolantes, como as amostras de atum, os resultados podem ser afetados devido à radiação de fundo (*bremstrahlung*) gerada pelo acúmulo de cargas na amostra, como observado em estudos desenvolvidos pelo grupo PIXE do IF-UFRGS^{30, 31}. Desta forma, a câmara de reações possui um filamento de tungstênio que, quando aquecido, gera uma nuvem eletrônica que é atraída para o potencial positivo na região de incidência do feixe, descarregando a amostra.

A visualização das amostras dentro da câmara de reações é feita através de uma webcam. Isto permite o posicionamento correto do feixe de prótons sobre as mesmas.

O sistema PIXE conta com dois detectores: um de germânio hiperpuro (HPGe) e um de silício dopado com lítio (Si(Li)). Finalmente o sistema se completa com um conjunto eletrônico de aquisição de dados.

Abaixo uma fotografia do equipamento disponível no Laboratório de Implantação Iônica, representado anteriormente de maneira esquemática na figura 2a.

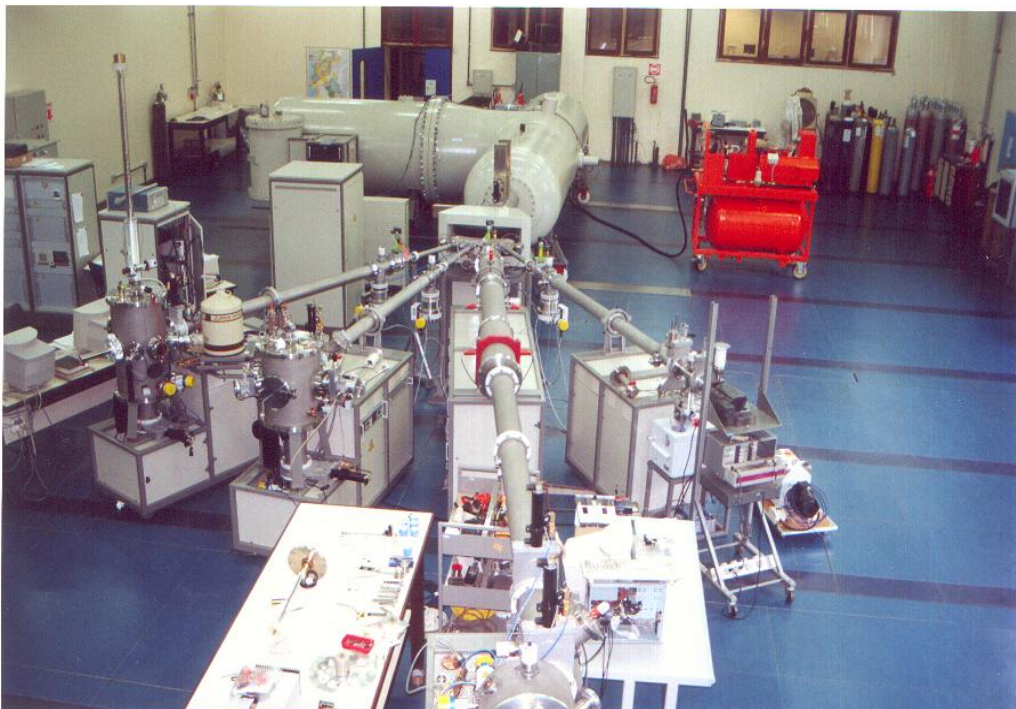


Figura 2 b: Fotografia do acelerador Tandatron® – 3MV, instalado no Laboratório de Implantação Iônica do IF-UFRGS.

3.2.2 PIXE - Detecção dos Raios-X Característicos

A incidência do feixe na amostra induz, dentre outros processos, a emissão de raios-X característicos. Os raios-X característicos emitidos pela amostra interagem com o detector majoritariamente através de efeito fotoelétrico. Os elétrons resultantes deste processo geram um pulso cuja amplitude é proporcional a energia do raio-X incidente, ou seja, a relação entre a amplitude do sinal e a energia do fóton incidente é linear. Estes pulsos passam primeiramente por um pré-amplificador, depois por um amplificador (aumentando a relação sinal-ruído), onde o sinal é amplificado e modelado em uma forma aproximadamente gaussiana. Este sinal chega ao ADC (*Analog to Digital Converter*) onde é convertido em um sinal digital.

A conversão é feita da seguinte forma: quando um pulso chega ao MCA (*Multi Channel Analyzer*) ocorre o carregamento de um capacitor. No processo de descarregamento deste capacitor acontece o disparo de um relógio que emite pulsos iguais, igualmente espaçados. Quando o carregamento encerra, o relógio para e pela quantidade de pulsos emitidos pelo relógio define-se a intensidade do sinal. O sinal, agora digitalizado, é registrado em um dos 1024 canais abertos para a coleta do espectro. Como resultado desta coleta de dados, obtém-se um espectro típico de contagens em função do canal (Figura 3).

Durante o processamento de um sinal, o equipamento tem um dispositivo que não permite que outro sinal seja processado, introduzindo assim um tempo morto de medidas e que deve ser levado em consideração no tratamento dos dados.

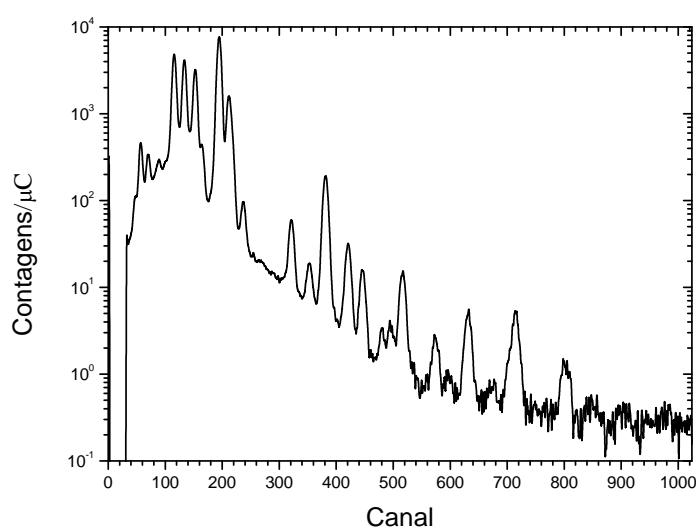


Figura 3: Espectro PIXE típico mostrando o número de contagens de raios-X por unidade de carga em função do canal.

Capítulo 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATRIZ COM RBS

Os tecidos musculares dos peixes, como todas as amostras de tecidos biológicos em geral, são compostos basicamente por C, N e O. A concentração relativa e a quantidade de massa destes elementos devem ser determinadas para que as análises PIXE tenham resultados confiáveis, uma vez que a matriz das amostras interfere nas concentrações dos elementos traço.

No nosso trabalho, esta análise foi feita usando a técnica de RBS. As características desta técnica estão descritas com detalhes no capítulo 6.1. A figura 4 mostra um espectro RBS típico de uma amostra de atum, juntamente com a simulação realizada com o aplicativo SIMNRA³². O resultado da simulação indica que a matriz das amostras de atum é composta de 70% de C e 15% de N e 15% de O.

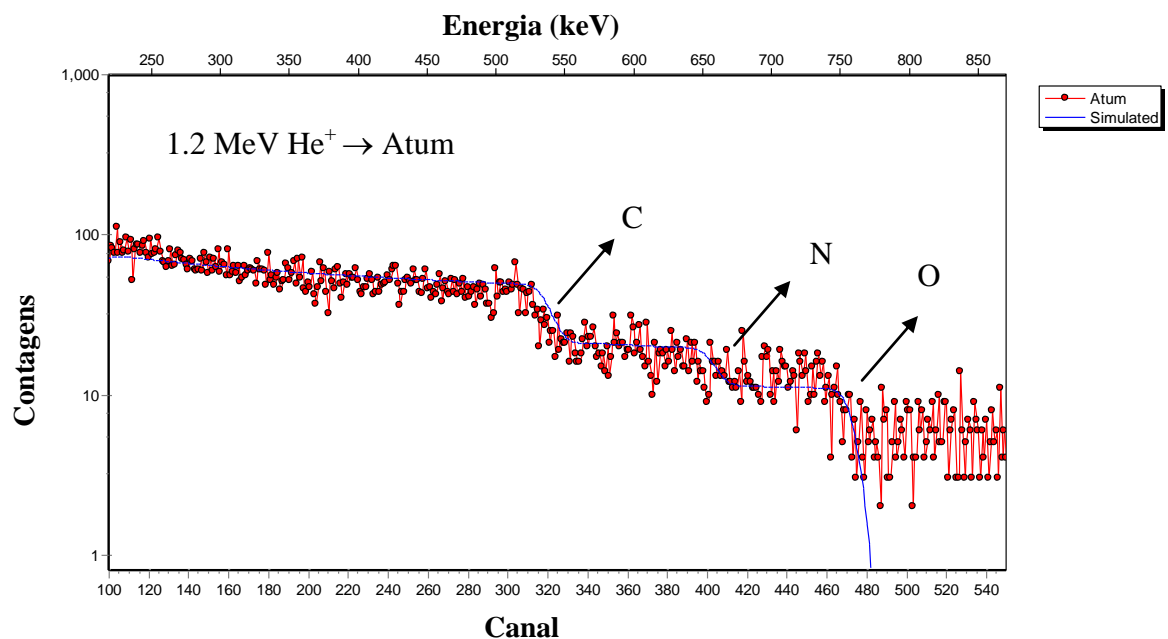


Figura 4: Espectro RBS típico mostrando o número de íons de He retroespalhados em função do canal para uma amostra de atum enlatado.

4.2 DETERMINAÇÃO DOS ELEMENTOS TRAÇO COM PIXE

Como descrito na seção 3.2.2, os resultados de PIXE são obtidos em espectros de contagens versus canal. Para realizar a interpretação destes espectros é necessário transformar os gráficos de contagens versus canal em gráficos de contagens versus energia do raio-X. Tal transformação necessita, portanto, medir uma amostra padrão cujas composição e concentração sejam especificadas e certificadas.

No presente trabalho foi utilizado o padrão DORM-2³³(Dogfish Muscle). A matriz deste padrão foi determinada com auxílio da técnica RBS: 64% de carbono; 24% de oxigênio; e 12% de nitrogênio. Os elementos utilizados para a calibração e, posteriormente, para a padronização (seção 6.2.7) estão listados na tabela 5. Os valores descritos na coluna denominada “Quantidade” são os valores certificados pelo fabricante do padrão (NRCC – National Research Council Canada).

Tabela 5: Valores de referência do padrão DORM-2 utilizado para calibração e padronização do sistema PIXE.

Elemento	Energia (keV)	Quantidade (ppm)
Al	1,487	10,9
Cr	5,415	34,7
Mn	5,899	3,66
Fe	6,405	142
Ni	7,478	19,4
Cu	8,048	2,34
Zn	8,639	25,6
As	10,544	18
Se	11,222	1,4
Ag	2,984	0,041
Cd	3,134	0,043
Hg	9,989	4,64

O espectro PIXE resultante da medida do padrão permite que se construa uma relação entre canal e energia do raio-X. Como pode ser observado na equação 1, esta relação é linear. A partir desta equação é possível transformar o gráfico contagens versus canal em um gráfico de contagens versus energia do raio-X (Figura 5).

Tendo-se obtido o espectro em função da energia é possível identificar os possíveis elementos presentes na amostra. Esta identificação é realizada associando-se os valores em energia dos principais picos do espectro àqueles constantes de uma tabela com as energias dos raios-X característicos de cada elemento.

Equação 1

$$Energia = 0.11141 + 0.01653 * canal$$

$$Canal = -6.74104 + 60.51186 * energia$$

As análises PIXE foram realizadas individualmente para cada pastilha de amostra confeccionada. Primeiramente foram feitos gráficos de contagens versus energia para as amostras de atum enlatado, a fim de determinar os possíveis elementos presentes (Figura 5).

É importante deixar claro que gráficos desta forma servem como auxiliares na análise e identificação inicial dos elementos. As diferenças observadas entre os espectros podem ser indicativas de diferenças na concentração elementar, mas afirmações conclusivas só podem ser feitas depois de análises quantitativas e estatísticas.

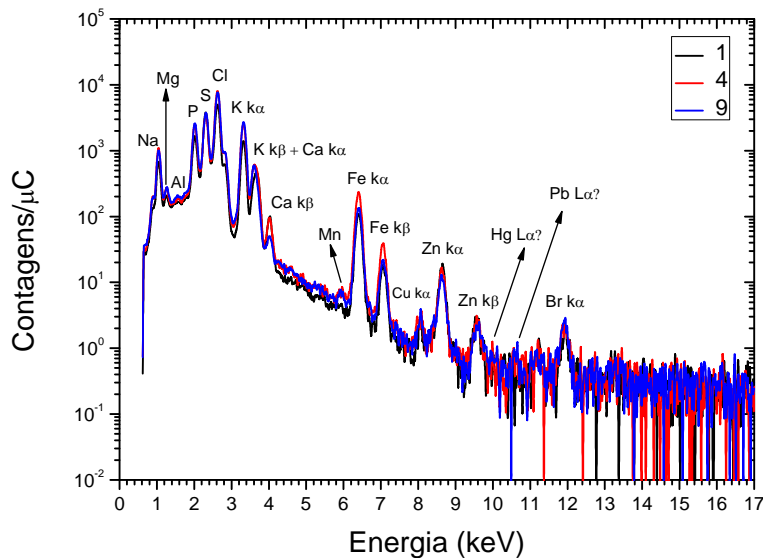


Figura 5: Espectro PIXE típico mostrando o número de contagens de raios-X por unidade de carga em função da energia de cada raio-X característico. As curvas apresentadas correspondem aos conteúdos das amostras 1, 4 e 9.

Assim, analisando o espectro acima apresentado, pode-se observar que os elementos que possivelmente compõem as amostras de atum enlatado são: Na, Mg, Al, P, S, Cl, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn e Br. Além destes, outros elementos também foram adicionados aos ajustes quando as análises quantitativas foram realizadas: Si, Ti, Cr, Ni, Rb, Sr, Mo, Hg e Pb. Este

mesmo conjunto de elementos foi utilizado nas análises quantitativas das demais amostras (atum em sachê, atum fresco e embalagens).

A composição elementar real do atum foi, então, obtida depois de análises e simulações realizadas com o aplicativo GUPIXWIN³⁴⁻³⁷ (ver anexo 6.2.7.1). Os resultados mostraram que os elementos presentes no atum enlatado são basicamente: Na, Mg, P, S, Cl, K, Ca, Fe e Zn (Tabela 6).

No procedimento de análise, quando se acrescenta como condição inicial a presença dos outros elementos, as simulações mostram um ajuste dos dados colocando valores iguais a zero para as respectivas contagens. No sentido de estudar com maior precisão a ocorrência ou não destes elementos e obter estimativas para os limites superiores nos quais poderiam estar presentes, foram realizadas medidas diferenciadas com tempo longo (1800s) e alta corrente (6nA). Os resultados e respectiva análise detalhada destes elementos são apresentados na seção 4.2.6.

A partir dos resultados contidos na tabela 6, foi possível realizar os comparativos das amostras de acordo com as variáveis descritas anteriormente na tabela 2 (marca, embalagem, fabricação e conserva).

Sabe-se que amostras biológicas e orgânicas apresentam alta variabilidade. Com base nisso, todos os estudos comparativos deste trabalho foram baseados em três testes estatísticos: teste-F, teste-t e teste-t de Welch^{38, 39}.

As análises comparativas das médias foram realizadas duas a duas. Primeiramente testou-se a variabilidade destas médias, através do teste-F, a fim de determinar qual o teste apropriado para determinar a igualdade ou não entre estas duas médias. No caso de variâncias equivalentes, utilizou-se o teste-t de variância combinada. Em contrapartida, no caso de variâncias não equivalentes, utilizou-se o teste-t de Welch.

Tabela 6: Concentração (ppm) dos principais elementos traço que compõem as amostras de atum.

Amostra	Na	Mg	P	S	Cl	K	Ca	Fe	Zn
1	17534 ± 2833	940 ± 221	5785 ± 961	2827 ± 1747	15831 ± 3193	6295 ± 1046	136 ± 44	107 ± 32	28 ± 9
2,3	18488 ± 4003	946 ± 287	5767 ± 906	3053 ± 857	15890 ± 4037	6677 ± 1396	116 ± 13	269 ± 42	25 ± 5
4	11218 ± 1627	1116 ± 169	5538 ± 907	498 ± 344	10696 ± 1534	6541 ± 1485	187 ± 110	48 ± 13	24 ± 10
5,6	13283 ± 8539	952 ± 234	4799 ± 1066	1404 ± 1112	11157 ± 7176	5388 ± 915	184 ± 88	58 ± 21	33 ± 12
7,8	10462 ± 2499	1085 ± 208	5688 ± 1037	2066 ± 1767	9810 ± 2080	6257 ± 1127	123 ± 52	54 ± 14	34 ± 5
9	11813 ± 1936	1012 ± 177	6309 ± 1307	1243 ± 244	8583 ± 2051	7487 ± 1358	145 ± 26	320 ± 40	21 ± 5
10	15962 ± 4806	854 ± 169	5365 ± 847	9614 ± 514	20921 ± 5894	6132 ± 1277	135 ± 12	124 ± 40	22 ± 11
11	14820 ± 7249	1048 ± 176	6643 ± 2288	9954 ± 1494	18381 ± 8375	7071 ± 1016	1010 ± 2464	223 ± 125	25 ± 9
12,13,14	23237 ± 6181	741 ± 196	4991 ± 1503	2201 ± 824	13325 ± 5200	4104 ± 1017	681 ± 488	123 ± 76	47 ± 19
15,16	14056 ± 2426	896 ± 153	5680 ± 625	9153 ± 609	19058 ± 3369	7079 ± 1072	121 ± 30	46 ± 27	16 ± 6
17	15091 ± 625	769 ± 182	5904 ± 1021	2409 ± 841	12149 ± 1387	5656 ± 492	715 ± 723	89 ± 22	32 ± 11
18,19	13698 ± 5593	896 ± 197	5837 ± 807	3971 ± 3671	11067 ± 5202	5971 ± 894	127 ± 47	166 ± 74	22 ± 8
20,21	15223 ± 2901	1111 ± 243	6948 ± 1918	8833 ± 1224	18637 ± 3007	8332 ± 854	149 ± 23	58 ± 20	15 ± 2
22	97761 ± 32371	1044 ± 291	51 ± 11	28 ± 5	7 ± 1	28 ± 6	0,8 ± 0,2	42 ± 16	55 ± 16
23	35601 ± 14080	512 ± 61	27 ± 2	18 ± 2	2,0 ± 0,1	15 ± 1	0,30 ± 0,05	14 ± 3	24 ± 2

4.2.1 Comparativo das Camadas de Atum Enlatado

A primeira análise comparativa foi feita entre as camadas de atum que ficam em contato direto com a lata. Comparou-se a composição e concentração elementar da parte superior e da parte inferior do conteúdo de atum.

De acordo com os resultados, as concentrações elementares das porções superior e inferior de cada uma das amostras são iguais. Sendo assim, os resultados correspondentes a estas duas porções foram agrupados em uma única média. Esta nova média foi, então, comparada com a média do conteúdo intermediário. Os resultados mostraram que as concentrações destas duas porções também são iguais.

Com base nestes resultados, todas as pastilhas do conteúdo de atum medidas para cada amostra foram agrupadas em uma única média com seu respectivo desvio padrão (tabela 6).

De acordo com os resultados obtidos, pode-se afirmar que não existem diferenças significativas na concentração elementar do conteúdo de atum armazenado nas latas, mesmo que algumas regiões fiquem em maior contato com as paredes metálicas da embalagem, em relação a outras. Conclui-se então, que o conteúdo dentro da lata é homogêneo.

A figura 6 mostra um espectro da concentração elementar das camadas (superior, intermediária e inferior) da amostra 1, onde visualmente pode-se observar a igualdade nas concentrações elementares.

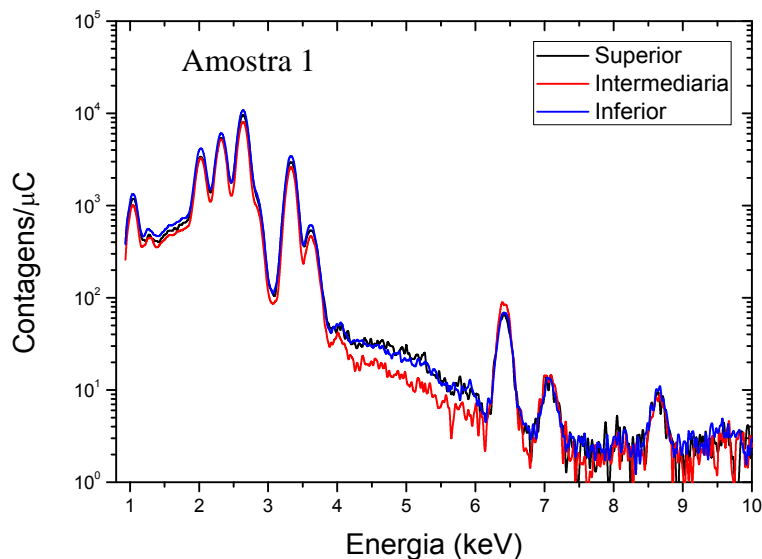


Figura 6: Espectro PIXE mostrando o número de contagens de raios-X por unidade de carga em função da energia do raio-X característico para as três camadas de atum analisadas para a amostra 1. As curvas são representativas da média de cada uma das camadas.

4.2.2 Comparativo das Paredes Internas das Embalagens

As concentrações elementares das 19 embalagens metálicas (latas) foram determinadas através de 2 amostras de cada uma, como descrito anteriormente na seção de preparação de amostras. Mediu-se a parede interna da tampa e a parede interna do fundo de cada lata.

Os resultados quantitativos foram agrupados em função da marca. Por exemplo, para a marca G analisamos três latas. Portanto:

- Tampa marca G = média (tampa 1 + tampa 2 + tampa 3)
- Fundo marca G = média (fundo 1 + fundo 2 + fundo 3)

Foram feitas comparações entre as concentrações de tampa e fundo de cada lata, para verificar a igualdade da concentração elementar das embalagens.

Os resultados indicam que as paredes internas das latas têm a mesma composição e concentração elementar. Após a validação dos resultados pelos testes estatísticos, concluiu-se que as latas têm uma composição interna homogênea. Desta forma, as médias de tampa e fundo de cada marca foram agrupadas em uma nova média, gerando três médias para as embalagens: LG – Lata marca G , LC – Lata marca C e LP – Lata marca P (Tabela 7).

A figura 7 mostra os espectros das latas das três marcas estudadas. Pode-se observar que as marcas G e C têm praticamente a mesma composição elementar, exceto pela concentração de Cl. A marca P, por sua vez, é composta por uma maior variedade de elementos.

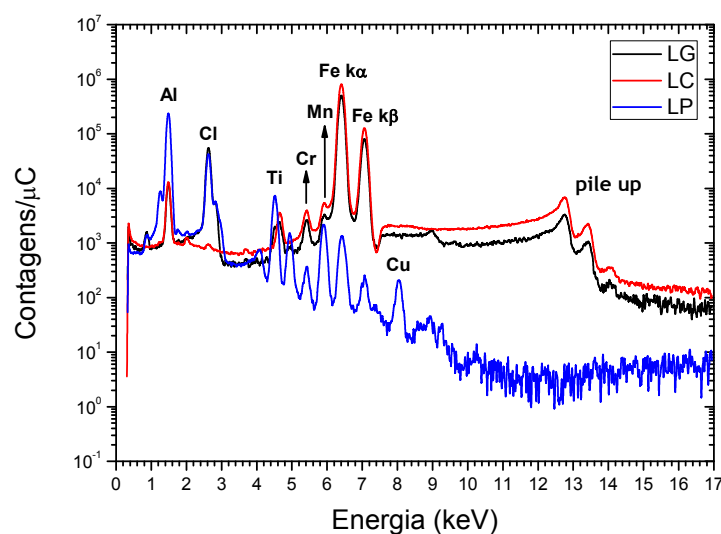


Figura 7: Espectro mostrando o número de contagens de raios-X por unidade de carga em função da energia do raio-X das latas das marcas G, C e P.

Tabela 7: Concentração (ppm) dos elementos traço que compõem as latas de atum das três marcas estudadas.

Lata	Al	Cl	Ti	Cr	Mn	Fe	Cu
LG	45955 ± 19380	3240 ± 2959	93 ± 33	766 ± 296	784 ± 206	283597 ± 76253	-
LC	61317 ± 32597	40 ± 19	137 ± 133	1209 ± 626	1544 ± 800	563237 ± 281879	381 ± 360
LP	635652 ± 160168	10030 ± 4949	78 ± 66	126 ± 58	3269 ± 2287	1762 ± 1166	666 ± 513

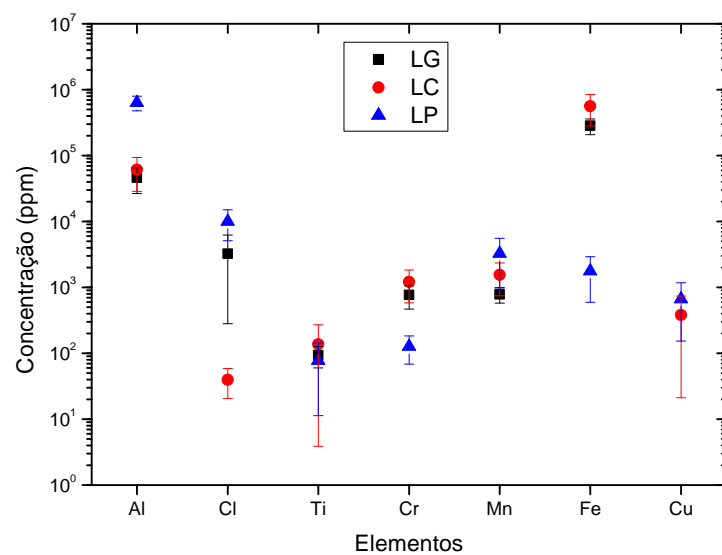


Figura 8: Concentração elementar (ppm) das latas de atum das três marcas estudadas: LG, LP e LC.

4.2.3 Comparativo das Conservas: Água X Óleo

Para realizar este comparativo foram utilizados os resultados quantitativos das amostras 17 e 18. Qualitativamente percebe-se uma diferença nas concentrações de K, Ca, e Zn (Figura 9). Entretanto, os resultados de testes estatísticos mostram que estas diferenças não são significativas. Sendo assim, pode-se considerar que o atum conservado em água ou óleo tem praticamente a mesma concentração elementar.

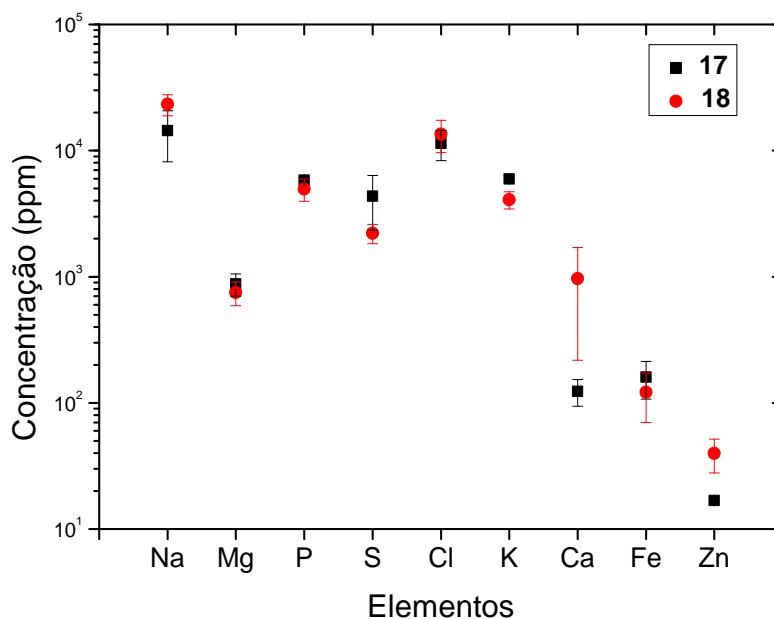


Figura 9: Comparativo da concentração elementar de duas amostras de atum da marca C: uma conservada em água e sal (17) e uma conservada em óleo (18).

Alguns estudos comparativos entre as conservas, água ou óleo, utilizadas no atum enlatado encontrados na literatura estão descritos abaixo.

Cappon⁴⁰ identifica que amostras de atum conservadas em água têm maior concentração de Hg em relação às conservadas em óleo. Porém, o número de amostras (N=8) é considerado pequeno para análises estatísticas. Yess⁴¹ também mostra que os níveis de metil-mercúrio nas amostras conservadas em água são maiores que nas amostras conservadas em óleo, com maior número de amostras (N=220). Entretanto, as baixas concentrações nas amostras conservadas em óleo podem estar relacionadas ao fato de os conteúdos não terem sido drenados antes da análise, enquanto que as amostras conservadas em água foram drenadas. Kayoumijan⁴² citado por esta mesma autora indica igualdade nas concentrações de Hg entre conservas de água e óleo.

4.2.4 Análises Temporais

Uma vez que já foi determinado que a composição do atum é homogênea dentro da lata, que a lata tem uma composição uniforme e que não existem diferenças na composição elementar do atum em função do tipo de conserva, resta avaliar se existe variação na composição destes alimentos em função do tempo que permanecem nas latas. Em outras palavras, determinar se existe troca de elementos entre a lata e seu respectivo conteúdo.

Para tal estudo, definiu-se um novo parâmetro: tempo de armazenamento (t.a.). Este parâmetro foi estabelecido como sendo o intervalo, em meses, entre a data nominal de fabricação e a data em que as latas foram abertas para a preparação das amostras (Tabela 8).

Tabela 8: Nova nomenclatura das amostras de acordo com a marca e com seus respectivos tempos de armazenamento, em meses.

Amostra	Novo nome	Embalagem	t.a. (meses)	Fabricação
1	TG1	lata	21	12/2006
2,3	TG2	lata	11	08/2007
4	TP1	lata	26	07/2006
5,6	TP2	lata	19	01/2007
7,8	TP3	lata	15	06/2007
9	TC1	lata	30	03/2006
10	TC2	lata	27	06/2006
11	TC3	lata	23	10/2006
12, 13, 14	TC4	lata	22	11/2006
15, 16	TC5	lata	17	04/2007
17, 18,19	TC6	lata	16	05/2007

Os resultados comparativos entre as marcas mostram que não existem variações temporais nos conteúdos elementares para a grande maioria dos elementos estudados. Porém, um possível aumento na concentração de Fe para as marcas G e C foi observado.

Para verificar este resultado, foram então estudadas mais três amostras de atum enlatado (1 de cada marca) para que pudéssemos ter pontos representativos dos primeiros meses de envasamento. O ideal seria analisar uma amostra de atum que tivesse sido recém embalado. Porém, o atum enlatado disponível no mercado tem

variações na data de fabricação, o que impediu que encontrássemos 3 latas com a mesma data de fabricação (Tabela 9).

Tabela 9: Amostras adicionais de atum utilizadas para análise temporal.

Amostra	Embalagem	t.a. (meses)	Fabricação
TG3	lata	1	9/2009
TP4	lata	5	4/2009
TC7	lata	11	10/2008

A figura 10 apresenta as concentrações de Fe presentes nas amostras de atum enlatado em função do tempo de armazenamento:

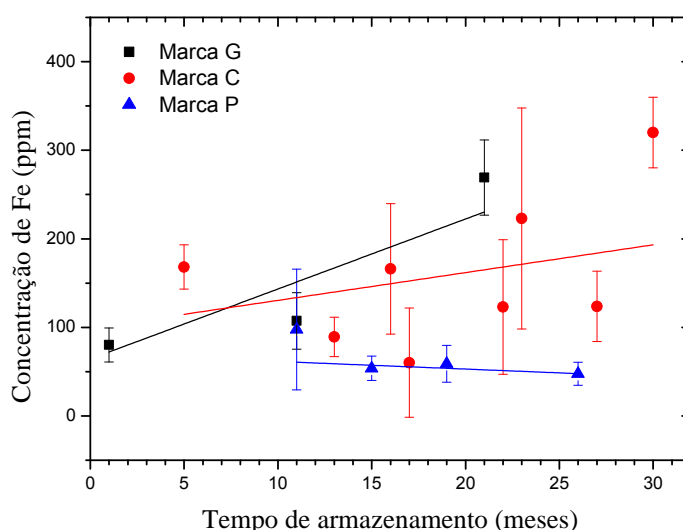


Figura 10: Concentração de Fe nas amostras de atum enlatado em função do tempo de armazenamento. As linhas representam os ajustes lineares realizados entre os pontos de cada uma das marcas.

Para verificar o possível aumento na concentração de ferro nas amostras, foram ajustadas retas aos pontos representativos de cada amostra. A tabela 10 lista os parâmetros resultantes dos ajustes.

Tabela 10: Parâmetros resultantes do ajuste linear dos pontos de cada marca.

Marca	Inclinação	Correlação
G	$7,91 \pm 3,7$	0.65
C	$3,1 \pm 3,1$	-0,002
P	$-0,8 \pm 0,7$	0,09

Observando os resultados dos ajustes, é possível observar que existe correlação positiva entre os pontos da marca G. Ou seja, um aumento da concentração de ferro no atum em função do tempo de armazenamento é observado para a marca G. Uma vez que a lata é hermeticamente fechada, podemos sugerir que o aumento de ferro é devido a uma migração desse elemento da lata para o atum.

Com base nestes resultados, verificou-se a possível existência de correlação entre a quantidade de Fe presente na lata e a quantidade de Fe presente no respectivo atum enlatado. O comparativo foi feito para as amostras TG1, TP2 e TC4, pois estas amostras têm praticamente o mesmo tempo de armazenamento.

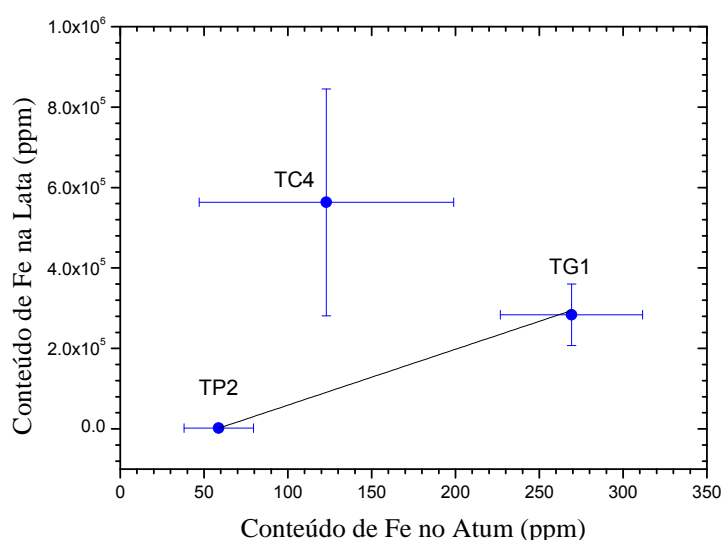


Figura 11: Gráfico representativo da quantidade de Fe presente na lata em função da quantidade de Fe presente no seu respectivo conteúdo. As amostras TP2, TC4 e TG1 estão identificadas.

Inclinação	Correlação
$1389,5 \pm 361,2$	0.68

De acordo com o ajuste linear destes três pontos, observa-se que existe correlação entre a concentração de ferro presente nas latas e a concentração de Fe presente no atum contido nas mesmas, porém, não se pode verificar uma regra geral para este comportamento uma vez que o número de pontos ajustados é muito pequeno.

A fim de se verificar se esse comportamento se aplica a outros alimentos enlatados, foi realizado um estudo para sardinhas enlatadas destas mesmas três marcas. As amostras de sardinhas foram preparadas praticamente da mesma forma que o atum enlatado. Para cada lata de sardinha foram produzidas 5 pastilhas do conteúdo e 2

pastilhas da embalagem - 1 da tampa e 1 do fundo, como para as latas de atum. As medidas e análises foram feitas da mesma forma que o atum e o agrupamento se deu em função da marca e do tempo de armazenamento (Tabela 11).

Tabela 11: Amostras de sardinha utilizadas para análise temporal do conteúdo de Fe.

<i>Identificação</i>	<i>Marca</i>	<i>Embalagem</i>	<i>Fabricação</i>	<i>Conserva</i>	<i>t.a.(meses)</i>
S1	G	lata	08/2009	óleo	1
S2	G	lata	07/2007	óleo	26
S3	G	lata	06/2006	óleo	39
S4	C	lata	06/2009	óleo	3
S5	C	lata	09/2006	óleo	36
S6	C	lata	05/2006	óleo	40
S7	P	lata	05/2009	óleo	4
S8	P	lata	09/2007	óleo	24
S9	P	lata	03/2007	óleo	30

Os resultados quantitativos mostram que a tendência de aumento de Fe com o tempo, observada no atum para as marcas 1 e 2, não se repete para a sardinha (Figura 10).

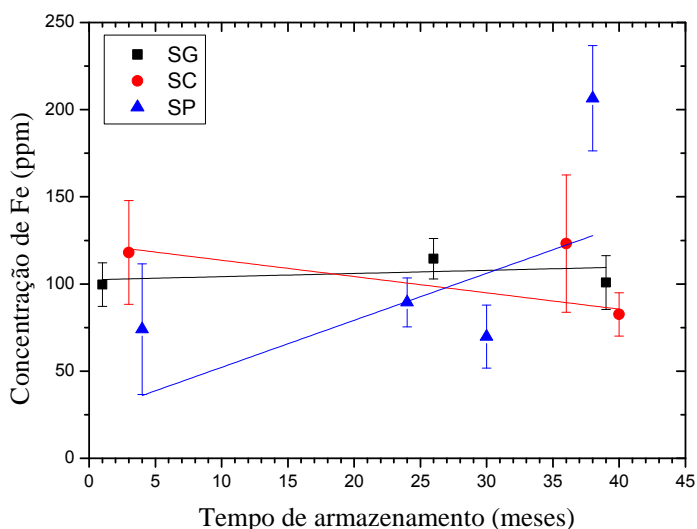


Figura 12: Concentração de Fe nas amostras de sardinha enlatada em função do tempo de armazenamento.

Tabela 12: Parâmetros resultantes do ajuste linear dos pontos de cada marca.

Amostra	Inclinação	Correlação
SG	$0,2 \pm 0,5$	-0,7
SC	$-0,9 \pm 0,9$	0,2
SP	$2,7 \pm 3,2$	-0,1

De acordo com o gráfico e com os ajustes acima apresentados, percebe-se que não ocorre aumento na concentração elementar do Fe em função do tempo de armazenamento para nenhuma das três marcas, uma vez que as correlações são compatíveis com zero.

A partir destes resultados, conclui-se que o aumento da concentração de ferro em função do tempo de armazenamento é uma característica particular observada somente para o atum da marca G.

Dantas⁴³ realizou estudo sobre a qualidade das latas utilizadas para armazenamento de atum. Foram avaliados três tipos de latas: duas cuja composição metálica era constituída basicamente por Fe e Cr (diferenciadas pela composição da resina interna), e outra composta somente por Al. Dentre os testes realizados, um foi semelhante ao presente estudo. Foram avaliadas as concentrações de Fe, Cr e Al nos conteúdos armazenados nas latas entre o dia “zero” até o dia 180 de armazenagem. As medidas foram realizadas com ICP-AES e os resultados indicam um aumento na concentração destes três elementos no conteúdo de atum.

4.2.5 Comparativo entre Atum Enlatado, em Sachê e Fresco

Verificou-se a existência de diferenças nas concentrações elementares de atum enlatado, atum em sachê e atum fresco. No caso de existência destas diferenças, é importante ressaltar que estas não poderiam ser relacionadas univocamente ao processo de industrialização. Para que estas comparações fossem realizadas com exatidão, seria necessário acompanhar o processo desde o momento da coleta dos peixes, como o trabalho de Rasmussen²². Ainda assim, nosso estudo aporta resultados até agora não medidos.

Este comparativo foi realizado com as amostras:

- Amostra #10 – atum enlatado da marca C → “Enlatado”;
- Média das amostras 20 e 21 – sachê da marca C → “Sachê”
- Média das amostras 22 e 23 – atum fresco → “Fresco”.

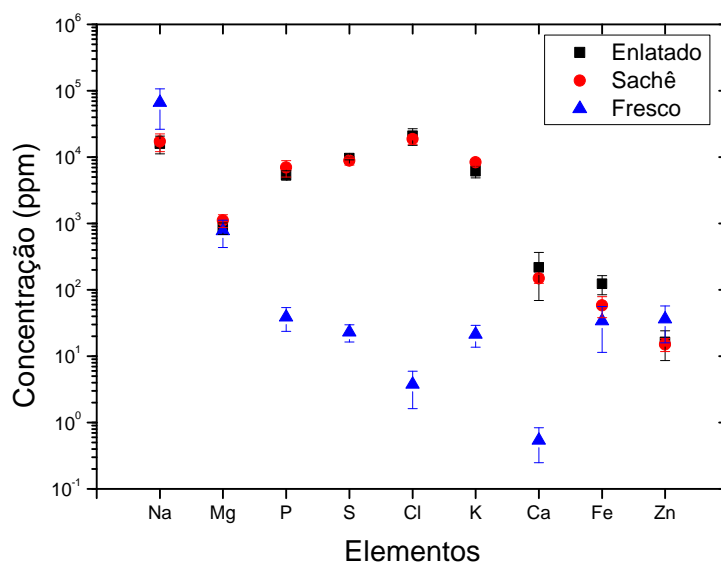


Figura 13: Comparativo qualitativo entre atum enlatado, em sachê e fresco. Os resultados mostram a concentração (ppm) de cada um dos elementos que compõem as amostras de sardinha.

De acordo com a figura 13, pode-se observar que as maiores diferenças estão presentes nas concentrações de P, S, Cl, K e Ca. A concentração destes elementos é praticamente a mesma para as amostras de atum enlatado e em sachê, mas muito mais baixas para o atum fresco. Isto conduz a ideia de que estes elementos têm sua origem nas conservas (água e/ou óleo) que são adicionadas ao atum durante a industrialização.

4.2.6 Análise dos Demais Elementos

Durante a análise elementar do atum, diversos elementos como, por exemplo, o Cu, Ti, Br, Hg e Pb apresentaram concentrações compatíveis com o limite de detecção do sistema.

Para confirmar a existência ou não destes elementos nas amostras, foram realizadas medidas diferenciadas com alta estatística, ou seja, tempo longo (1800s) e alta corrente de feixe (6nA).

Os resultados foram tratados da mesma forma que para os demais elementos discutidos neste trabalho. Na tabela abaixo (tabela 13) mostramos os resultados das médias das concentrações e os respectivos limites de detecção para amostras correspondentes às 3 marcas de atum anteriormente especificadas.

Tabela 13: Média e desvio padrão dos elementos verificados com as medidas de alta estatística. A coluna LOD representa o limite de detecção para cada elemento, resultantes das simulações com o GUPIX.

<i>Elemento</i>	<i>Concentração(ppm)</i>	<i>LOD($\mu\text{g g}^{-1}$)</i>
Al	$1,4 \pm 1,7$	$4,0 \pm 1,7$
Ti	$1,3 \pm 0,4$	$0,6 \pm 0,2$
Cr	$1,0 \pm 0,4$	$1,2 \pm 0,7$
Mn	$1,5 \pm 0,3$	$1,5 \pm 0,8$
Cu	$3,1 \pm 1,0$	$0,7 \pm 0,3$
Br	$13,5 \pm 3,8$	$2,7 \pm 1,3$
Rb	$2,4 \pm 1,3$	$6,2 \pm 2,3$
Sr	$2,9 \pm 0,3$	$7,5 \pm 3,8$
Mo	$8,3 \pm 3,6$	$10,9 \pm 5,0$
Hg	$3,3 \pm 0,1$	$4,3 \pm 1,9$
Pb	$3,2 \pm 0,6$	$4,7 \pm 2,3$

Como pode ser visto, as médias dos elementos são compatíveis com os limites de detecção do experimento, exceto para o Cu e o Br.

O cobre é um elemento essencial às plantas e aos animais⁴⁴. A ingestão de Cu se torna tóxica se for maior que 250 mg. Em uma pessoa de 70 kg, a massa total de Cu é, em média, 73 mg. A ingestão diária segura fica em torno de 2-5 mg/dia. Se tomássemos o maior valor detectado para o Cu, exposto na tabela 13, teríamos que cada kg de atum enlatado contém 3,5 mg de Cu. Uma lata de atum tem 83 g de peso drenado. Fazendo os cálculos vemos que cada lata de atum tem aproximadamente 0,3mg de Cu. Sendo assim,

uma pessoa poderia ingerir uma quantidade equivalente ao conteúdo de 7 latas de atum por dia, sem correr o risco de intoxicação por Cu. Vale ressaltar que a maior parte das medidas não indicou contagens para este elemento.

O bromo é encontrado em níveis de traço em humanos. Também é considerado um elemento químico essencial, entretanto ainda não se conhece exatamente as funções que realiza. Alguns de seus compostos têm sido empregados no tratamento contra a epilepsia e como sedantes.

Para os demais elementos, podemos tomar o limite de detecção como sendo o limite superior da possível concentração desses elementos nas amostras estudadas.

Tomando este limite máximo de concentração (LOD) pode-se fazer um comparativo entre as concentrações que determinamos no atum e os limites máximos permitidos pela ANVISA e FAO, citados na tabela 1, da seção 2.1.

Tabela 14: Relação entre os níveis de elementos tóxicos regulamentados e os limites de detecção de PIXE.

Elemento	ANVISA (mg/kg)	Pessoa de 65kg(mg)	LOD(ppm)- PIXE	Nível Seguro
As	1,0	0,975	-	Sim
Cu	-	3,25-32,5	$3,1 \pm 1$	Sim
Cd	1,0	0,455	-	Sim
Sn	-	910	-	Sim
Hg	1,0	0,325	$4,3 \pm 1,9$?
Pb	2,0	1,625	$4,7 \pm 2,3$?

A toxicidade do As é alvo de estudos pois acredita-se que é um elemento carcinogênico. Na maioria dos materiais biológicos humanos, a concentração deste elemento é da ordem $1\mu\text{g}/\text{kg}$. Nossas primeiras análises com PIXE não indicaram qualquer quantidade deste elemento.

O limite de ingestão diária do Cd fica entre 0,007 e 3mg. A ingestão é tóxica entre 30 e 300mg, e a ingestão letal fica entre 1,5 e 9g. Assim como para o As, as medidas PIXE não indicaram a presença de Cd nas amostras analisadas.

O Sn é utilizado no revestimento de latas de alimentos, mas sua liberação para o produto alimentício contido é mínima. Assim como para o Cd, as medidas PIXE não indicaram a presença de Sn nas amostras analisadas.

A presença e toxicidade do Hg nos alimentos já foram discutidas na revisão bibliográfica deste trabalho. Se considerássemos o limite de detecção de mercúrio apresentado na tabela 14, uma lata de atum conteria aproximadamente 0,4mg de Hg. Este valor estaria compatível com o limite de consumo diário estabelecido pela FAO para uma pessoa de 65kg, entretanto, o valor contido em cada kg de atum estaria acima do valor permitido pela ANVISA.

O chumbo é um dos elementos tóxicos mais bem conhecidos e um dos maiores poluentes. É primariamente introduzido na atmosfera principalmente pelo uso de gasolina e a deposição nas plantas e no solo gera acumulação deste elemento. A contaminação deste poluente nos humanos se dá via inalação e ingestão. No caso do atum, existem relatos de pequenas concentrações destes elementos, mas a maioria abaixo dos limites permitidos. No caso do presente trabalho, se levássemos em consideração o limite de detecção do Pb, a quantidade presente em cada kg de atum enlatado estaria acima do limite permitido pela ANVISA, mas o conteúdo respectivo a uma lata de atum estaria abaixo dos limites de consumo diário indicados pela FAO.

Capítulo 5

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados deste trabalho, pode-se concluir que o atum enlatado é composto, basicamente, por: Na, Mg, P, S, Cl, K, Ca, Fe e Zn. As concentrações destes elementos variam entre 16 ppm (Zn) e 23000 ppm (Na). O sódio é o elemento mais abundante, seguido pelo Cl (aprox. 19000 ppm), K (aprox. 7000 ppm) e P (aprox. 6000 ppm). O elemento menos abundante é o Zn, variando entre 15 e 50 ppm.

A análise das diferentes camadas de atum enlatado mostra que apesar de parte do conteúdo estar em contato direto com a lata e outra parte não, não existem diferenças nas concentrações elementares dos elementos presentes no atum.

As embalagens também foram avaliadas quanto a composição interna e verificou-se que as tampas superiores e inferiores possuem a mesma concentração elementar. As latas são compostas basicamente por Al, Cl, Ti, Cr, Mn, Fe e Cu, com concentrações variando entre 40ppm (Cl) e 635000 (Al). O elemento mais abundante nas latas das marcas G e C é o Fe com concentrações entre 28300 – 56000 ppm aproximadamente. Para as latas da marca P, o elemento mais abundante é o Al, com concentrações da ordem de 630000ppm.

Apesar de conservados com meios de cobertura diferentes, atuns enlatados com óleo ou com água e sal têm praticamente a mesma composição e concentração dos elementos estudados.

As análises temporais mostram que existe uma tendência de aumento de Fe em função do tempo de armazenamento para atuns enlatados da marca G. Para as marcas C e P não existe variação em nenhum dos elementos. Este comportamento foi investigado para sardinhas enlatadas, para as três marcas estudadas no caso do atum. Para estas amostras verificou-se que não existe variação da concentração elementar em função do tempo de armazenamento.

Um comparativo qualitativo de amostras de atum enlatado, atum em sachê e atum fresco mostra que o atum fresco possui menor concentração de P, S, Cl, K e Ca. Isso nos leva a concluir que estes elementos são adicionados ao atum através dos meios de conserva (água e sal e/ou óleo).

A análise dos elementos Al, Ti, Cr, Mn, Cu, Br, Rb, Sr, Mo, Hg e Pb, cujas contagens não nulas são compatíveis com os limites de detecção do nosso sistema

PIXE, indica que a presença destes elementos não pode ser afirmada. Se tomássemos os limites de detecção como sendo os limites máximos contidos nos conteúdos de atum enlatado, teríamos que os valores estão abaixo dos limites estabelecidos pela FAO¹¹.

Sendo assim, o atum comercializado no mercado local de Porto Alegre não apresenta concentrações de elementos como As, Cd, Hg e Pb, levando a conclusão de que este é um alimento seguro quanto a sua composição e concentração elementar.

Os resultados de PIXE são obtidos em “ppm dry weight”. Este é o primeiro trabalho que apresenta resultados de concentração elementar de atum enlatado desta forma. Sendo assim, nossos resultados não foram comparados de maneira quantitativa com os demais trabalhos contidos na literatura, pois estes apresentam os resultados em “ppm wet weight”.

Desta forma, nosso trabalho poderá servir de referência para os próximos trabalhos que obtenham resultados em “dry weight”.

Capítulo 6

TÉCNICAS ANALÍTICAS COM FEIXES DE ÍONS

Interação dos Íons com a Matéria^{45, 46}

O mecanismo fundamental de interação entre uma partícula eletricamente carregada e um meio material consiste na interação eletromagnética da partícula com os átomos que constituem o meio. A interação eletromagnética resultante da penetração do íon na matéria se manifesta de várias maneiras. O campo elétrico do íon incidente pode produzir excitações ou ionizações dos átomos do alvo. De maneira recíproca, a interação com os átomos do alvo pode excitar ou ionizar o íon incidente bem como fazer com que o mesmo capture elétrons do meio.

As excitações e ionizações do íon incidente ou do alvo ocorrem através da transformação de parte da energia cinética do íon incidente em energia de excitação ou ionização. Como consequência, esta interação íon-matéria resulta no freamento progressivo do íon. Outro efeito que contribui para o freamento do projétil é a transferência de energia cinética para os átomos do alvo como um todo, colocando-os em movimento.

A taxa de perda de energia por unidade de comprimento percorrido pelo íon é denominada poder de freamento. A parcela do poder de freamento correspondente aos processos de excitação e ionização é denominada poder de freamento eletrônico. A parcela devida à transferência de energia aos átomos do alvo é denominada poder de freamento nuclear.

Baseado nestes conceitos vamos descrever com mais detalhes as técnicas RBS e PIXE, resultantes da interação de íons com a matéria.

6.1 ESPECTROMETRIA DE RETROESPALHAMENTO RUTHERFORD

6.1.1 Introdução

A espectrometria de retroespalhamento Rutherford²⁹ utiliza íons de energia da ordem de MeV e é aplicada extensivamente na determinação precisa da composição de materiais, na distribuição de impurezas e na determinação de espessura de filmes. A medida do número e da energia dos íons retroespalhados pelos átomos na região próxima da superfície dos materiais permite a identificação de suas massas atômicas e a determinação da distribuição dos elementos do alvo, em função da profundidade da amostra. A sensibilidade desta técnica varia de alguns por cento para elementos de baixo número atômico, até 10 partes por milhão para elementos pesados, ou seja, de alto número atômico.

6.1.2 Princípios Básicos

O conceito desta técnica é simples. Um feixe colimado de partículas α (núcleos de He) incide perpendicularmente na amostra. As partículas que constituem o feixe podem colidir frontalmente com os átomos da amostra, entretanto, este processo tem baixa probabilidade porque a dimensão dos núcleos atômicos é pequena.

Considerando um alvo fino, praticamente todas as partículas incidentes atravessam o mesmo, sofrendo apenas uma pequena perda de energia. As poucas partículas que colidem com os átomos da amostra sofrem grandes mudanças em sua energia e direção.

Se a amostra é espessa, somente as partículas espalhadas em ângulos maiores que 90° com relação a direção de incidência do feixe podem ser detectadas, por isso o nome espectrometria de (retro)espalhamento.

Esta pequena fração de partículas retroespalhadas atinge a área definida pelo ângulo sólido do detector e pode ser analisada em energia. Em geral são utilizados detectores de estado sólido que produzem um sinal de tensão analógico proporcional à energia da partícula detectada. O sinal é discretizado em intervalos de energia denominados canais. Cada evento de retroespalhamento é registrado como uma contagem no canal respectivo à magnitude do sinal detectado. Ao final da aquisição de dados cada canal tem registrado um número de contagens, respectivo ao número de

partículas detectadas, que quando traçado em um gráfico de contagens versus canais constitui o espectro de RBS.

6.1.3 Interpretação do sinal

A interpretação dos sinais presentes no espectro de retroespalhamento tem como base princípios físicos simples, como:

a) Fator Cinemático

A transferência de energia do projétil ao um núcleo da amostra em um processo de colisão elástica entre dois corpos. Este processo conduz ao conceito de fator cinemático (K), que é definido como a razão entre a energia do projétil depois da colisão (E_{out}) e a energia antes da colisão (E_{in}):

$$K = \frac{E_{out}}{E_{in}}$$

Supondo colisões elásticas (a condição necessária é que a energia do feixe seja muito maior que a energia de ligação dos átomos do alvo, porém não tão alta a ponto de provocar reações nucleares) entre duas partículas isoladas e considerando a conservação de energia e de momentum, pode-se mostrar que:

$$K(M_1, M_2, \theta) = \left\{ \frac{[1 - (M_1/M_2)^2 \text{sen}^2 \theta]^{1/2} + (M_1/M_2) \text{cos} \theta}{1 + (M_1/M_2)} \right\}^2$$

Onde M_1 e M_2 são as massas atômicas do projétil e do átomo do alvo, respectivamente, e θ é o ângulo de espalhamento.

Considerando que a intensidade do feixe praticamente não sofre atenuação, a probabilidade de espalhamento por um átomo de um determinado elemento, em qualquer profundidade, é proporcional ao número de átomos deste elemento presente na amostra.

b) Seção de Choque Diferencial de Espalhamento

A probabilidade de ocorrência de um evento de espalhamento é descrita pela seção de choque diferencial de espalhamento ($d\sigma/d\omega$). Rutherford calculou-a supondo um potencial Coulombiano:

$$V(r) = \frac{Z_1 Z_2 e^2}{r}, \text{ onde } Z_1 \text{ é a carga do projétil e } Z_2 \text{ é a carga do alvo.}$$

Nessas condições, a seção de choque diferencial no sistema de referência do Centro de Massa, é dada por:

$$\frac{d\sigma}{d\omega} = \left[\frac{Z_1 Z_2 e^2}{4E_{CM} \text{sen}^2(\theta_{CM}/2)} \right]$$

Nesta equação E_{cm} é a energia no sistema de referência do centro de massa. Já no sistema de referência do laboratório, a seção de choque diferencial é dada por:

$$\frac{d\sigma}{d\omega} = \left[\frac{Z_1 Z_2 e^2}{4E \text{sen}^2(\theta_{CM}/2)} \right] \frac{[(1 - x^2 \text{sen}^2 \theta)^{1/2} + x \cos \theta]^2}{(1 - x^2 \text{sen}^2 \theta)^{1/2}}$$

Onde, E é a energia do sistema de referência do laboratório, $x \equiv M_1/M_2 \leq 1$ e,

$$\text{tg} \theta_{CM} = \frac{\text{sen} \theta}{\cos \theta + x}$$

De acordo com as equações acima apresentadas, pode-se constatar que:

- A seção de choque é proporcional a Z_1^2 , o que significa que a sensibilidade de detecção de um dado átomo é diretamente proporcional ao número atômico dos átomos do feixe.
- A seção de choque é proporcional a Z_2^2 , ou seja, a sensibilidade de detecção será maior para elementos mais pesados.
- A seção de choque é inversamente proporcional a ao quadrado da energia do feixe, ou seja, quanto maior a energia do feixe, menor a sensibilidade de detecção.
- A sensibilidade diminui rapidamente quando se aumenta o valor de θ .

c) Seção de Choque de Freamento

A perda média de energia de um átomo se movendo através de um meio denso. Este processo leva a definição da seção de choque de freamento e à capacidade de determinar um perfil de profundidade;

d) Stragglings de Energia

As flutuações estatísticas na perda de energia de um átomo se movendo através de um meio denso. Este processo conduz a definição de stragglings de energia e a uma limitação na determinação da massa final e da resolução em profundidade de um espectro de retroespalhamento.

6.1.3.1 Ajuste com o SIMNRA

SIMNRA²⁹ é um programa Microsoft Windows utilizado para a simulação de espectros de retroespalhamento para análises com feixes de íons da ordem de MeV. O programa tem múltiplas funções: simulações de espalhamento Rutherford e não-Rutherford, reações nucleares e análise de átomos por recuo elástico. No nosso caso interessam as simulações de RBS.

A simulação dos espectros leva em conta os parâmetros experimentais de grande importância, tais como: o tipo de íon incidente, energia do íon incidente, ângulos: de entrada, de saída e de espalhamento, densidade de partículas incidentes, resolução em energia dos detectores, seções de choque de espalhamentos, fator cinemático, etc.

O programa requer também uma calibração em energia que deve ser realizada com um alvo padrão cujas concentrações são conhecidas. A calibração é feita através de um ajuste linear de pontos de uma correspondência entre canal e energia, de maneira similar ao que é feito por PIXE, descrito na seção 4.2 deste trabalho.

6.2 EMISSÃO DE RAIOS-X INDUZIDA POR PARTÍCULAS ²⁴

6.2.1 Breve Histórico ^{24, 47}

1914 – Moseley: estudou as linhas de emissão de raios-X característicos de vários elementos da tabela periódica com auxílio de um tubo de raios-X desmontável e filme fotográfico. Conseguiu enxergar as linhas do Cu e do Ni em uma amostra de latão.

1922 – Hadding: analisou vários minerais com espectrometria de raios-X e comparou com resultados de métodos químicos convencionais. Obteve concordância qualitativa, mas não tinha conhecimento de parâmetros analíticos para uma análise quantitativa.

PROBLEMA: aquecimento da amostra em função de uma corrente de 10mA e 40kV.

1950 – Castaing: mostrou que os raios-X emitidos pela amostra em um microscópio eletrônico poderiam ser explorados para análise multielementar.

1912 – Chadwick: mostrou que partículas mais pesadas que elétrons poderiam provocar a emissão de raios-X. Com uma fonte radioativa gerou partículas alfa e induziu emissão de raio-X característico, porém com intensidade muito baixa.

1950 – Este problema começou a ser solucionado com o surgimento dos aceleradores de partículas em função do rápido crescimento das pesquisas em física nuclear. Nesta época o estudo da emissão de raios-X mostrou-se importante, pois estes apareciam no background dos experimentos de física nuclear. Uma vez que a seção de choque para a produção de raios-X característicos é a mesma tanto para prótons da ordem de MeV quanto para elétrons da ordem de 10 keV, a sensibilidade da análise é determinada principalmente pelo background de bremsstrahlung (em primeira aproximação é igual ao quadrado da razão das massas). Experimentalmente o background produzido pelos prótons é insignificante e a contribuição principal é devida aos elétrons secundários resultantes do feixe de prótons.

1960 – Khan e colaboradores: usaram prótons de baixa energia (100 keV) para medir a espessura de filmes finos, mas a resolução em energia não era suficiente para resolver elementos adjacentes.

– Pole e Shaw (Harwell): tentaram desenvolver um feixe de prótons análogo ao microfeixe de elétrons. Colimaram o feixe de um acelerador em um diâmetro de 100 μ m. Não houve espectros publicados, mas sabe-se que a razão pico-background foi mais alta para prótons do que para elétrons, como esperado.

Nesta época houve um progresso na tecnologia de detectores de estado sólido de barreira de superfície: detector de Ge(Li) para espectrometria de raios- γ e de Si(Li) para espectrometria de raios-X, com resolução de 150eV, permitindo resolver as linhas K de elementos adjacentes.

1970 – Johansson e colaboradores: mostraram que a combinação de prótons excitados a 2 MeV e a detecção de raios-X com um detector de Si(Li) constituía um método poderoso para análise multielementar de elementos traço. Uma de suas primeiras medidas foi com um filtro de carbono que continha resíduos de poluição do ar. Este novo método analítico, chamado de *Particle Induced X-ray Emission* (PIXE), foi testado e aplicado em muitos laboratórios de física nuclear nos anos 70.

O rápido desenvolvimento da técnica se deu pelo interesse crescente em problemas ambientais como poluição atmosférica e a presença de elementos tóxicos no meio ambiente e em seres humanos. Também houve um aumento na disponibilidade de aceleradores de partículas, uma vez que estes já estavam obsoletos para pesquisas na área de física nuclear. Uma terceira razão de interesse no PIXE foi o desenvolvimento da técnica de micro-feixe.

1972 – Cookson e colaboradores: desenvolveram um feixe focalizado utilizando um sistema de quadrupolos magnéticos, alcançando uma melhor resolução espacial de 4 μ m.

1975 – Tem início a utilização da técnica PIXE no Brasil com o projeto PIXE-SP(IF-USP). Estudos de poluição atmosférica através da análise elementar de aerossóis atmosféricos foram realizados.

No início da década de 90, surge o LAMFI – Laboratório de Análise de Materiais por Feixes Iônicos no IF-USP, após a aquisição de um acelerador tipo pelletron de 1,7 MV de tensão terminal.

1995 – Laboratórios utilizam feixes de 1 μ m e correntes de 1pA. Em 1995, Cahill et al., listaram 127 grupos de PIXE em 35 países diferentes, estimando que 110-115 eram programas ativos.

No final da década de 90, o Laboratório de Implantação Iônica do Instituto de Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (IF-UFRGS) deu início a operação de um acelerador do tipo tandem da High Voltage Engineering Europa (HVEE) de 3MV de terminal. Juntamente com esse acelerador, entrou em funcionamento a linha PIXE do IF-UFRGS. Entretanto, devido a vários problemas técnicos, as análises quantitativas passaram a ser realizadas a partir de 2000, dando

início a uma série de trabalhos, principalmente nas áreas ambientais e biológicas. Assim, o IF-UFRGS passou a ser o segundo laboratório no Brasil a realizar análises quantitativas de materiais com a técnica PIXE.

2001 - Entrou em operação no Laboratório de Colisões Atômicas e Moleculares (LaCAM) do Instituto de Física da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IF-UFRJ) uma linha PIXE com feixe externo, com o objetivo inicial de estudar amostras arqueológicas.

Hoje em dias, diversos laboratórios no mundo desenvolvem pesquisas com uso de PIXE. Como exemplo, o Museu do Louvre em Paris tem um grupo PIXE especializado em arqueologia e artes; o laboratório CSIRO na Austrália tem grupo PIXE especializado em mineralogia.

6.2.2 Características Gerais da Técnica

Como o próprio nome já diz, PIXE é uma técnica baseada na produção de raios-X característicos induzidos pela interação dos átomos da amostra com um íon que passa pela sua vizinhança. A amostra a ser analisada é irradiada por partículas positivas aceleradas e os raios-X emitidos pela desexcitação dos átomos da amostra são analisados com auxílio de um sistema de detecção.

6.2.3 Princípios Básicos

Fisicamente falando, o feixe de íons que incide na amostra interage com os átomos desta através de um potencial coulombiano, perdendo energia e consequentemente velocidade. Neste processo de transferência de energia entre o feixe e os átomos da amostra, elétrons das camadas mais internas dos átomos da amostra podem ser ejetados gerando uma vacância em seu lugar. Neste caso dizemos que o átomo se encontra em um estado excitado com excesso de energia correspondente à energia transferida pelo íon incidente. O átomo, então, tende a restabelecer seu estado de menor energia reordenando seus elétrons. Elétrons que estão em camadas mais externas tendem a preencher estas vacâncias e tal transição de camadas pode resultar na emissão de um raio-X característico.

Outro processo que pode ocorrer nestas circunstâncias é a emissão de um elétron, chamado elétron Auger. A probabilidade de emissão de um elétron Auger é maior para elementos de baixo número atômico, enquanto que a probabilidade de emissão de um raio-X característico é próxima de 1 para elementos pesados e de alguns por cento para os elementos mais leves.

Diz-se que este raio é característico porque está diretamente relacionado com a diferença de energia das camadas eletrônicas envolvidas na transição. Como cada elemento da tabela periódica tem um arranjo único de camadas eletrônicas, o raio-X emitido representa univocamente um determinado elemento da tabela periódica.

A classificação para as linhas de emissão de raios-X é feita de acordo com as transições eletrônicas que podem ocorrer dentro do átomo. Se os raios-X são provenientes de uma transição da camada L para a camada K, são denominados $K\alpha$, se for uma transição M-K chama-se $K\beta$. Esta notação é extensível para as transições que envolvem outras camadas eletrônicas, como por exemplo, uma transição $M \rightarrow L$ é chamada de $L\alpha$, e assim por diante. A detecção destes conjuntos de raios-X permite a construção de um espectro onde os diversos elementos podem, em princípio, ser identificados através da sua energia.

O espectro de energia de raios-X consiste em um background contínuo com as linhas de raios-X dos átomos presentes na amostra. Uma vez que o espectro pode ser bem complicado, com muitos picos e sobreposições, um computador é utilizado para a sua deconvolução.

O background que se estende abaixo das linhas de raio-X é um dos principais fatores determinantes do limite de detecção para um elemento. Esta região do espectro é resultante de diversos fatores: bremsstrahlung do próton incidente, bremsstrahlung dos elétrons, reações nucleares e raios- γ .

6.2.4 Radiação de Fundo

O processo de emissão de raios-X característicos é, em geral, acompanhado por outros processos. O espectro de raios-X característicos apresenta, em geral, um fundo devido a outras radiações eletromagnéticas que são detectadas pelo sistema. Pode-se classificar a radiação de fundo em dois grupos: radiação natural e radiação induzida.

A radiação natural inclui tanto os raios cósmicos como toda radiação proveniente de materiais radioativos presentes ao redor do detector (incluindo as paredes e o ar). Essa radiação de fundo pode, em geral, ser reduzida se o detector for protegido com uma blindagem. No Laboratório de Implantação Iônica do IF-UFRGS, o detector é protegido com uma cápsula de alumínio que ajuda na blindagem de radiações de baixa energia.

A radiação induzida engloba qualquer processo relacionado com o íon incidente na amostra. Inicialmente, o íon incidente pode sofrer diversos espalhamentos nos constituintes internos do acelerador como, por exemplo, nos colimadores que definem a forma e o tamanho do feixe. O feixe também pode ser espalhado por outros elementos dentro da própria câmara de reações. Esses espalhamentos podem gerar a produção de raios-X nos materiais espalhadores que, eventualmente, podem ser detectados pelo detector. No IF-UFRGS essa contribuição para a radiação de fundo foi minimizada com um revestimento interno da câmara de reações com um polímero e, ao mesmo tempo, colocando-se colimadores de carbono para minimizar o halo de partículas que viaja com o feixe. A eficiência deste procedimento deve-se ao fato de que raios-X provenientes de elementos leves como o carbono, oxigênio e nitrogênio não são detectados pelo sistema.

Outro tipo de radiação induzida é a radiação de freamento (*bremsstrahlung*), que surge quando uma partícula carregada sofre algum tipo de aceleração. No processo de interação íon-matéria, o íon perde energia ao longo de sua trajetória no material, sendo freado constantemente. Ao mesmo tempo, elétrons secundários são emitidos dos átomos constituintes da amostra. Tanto o íon que está sendo desacelerado quanto os elétrons secundários emitem esta radiação de freamento. A contribuição devida ao íon incidente pode ser considerada desprezível, mas a radiação de freamento emitida pelos elétrons secundários pode constituir uma fração apreciável da intensidade do espectro observado para energias abaixo de 10 keV. Em geral, todo espectro PIXE apresenta raios-X sobrepostos com o fundo gerado por elétrons secundários. A razão entre a intensidade

desses raios-X característicos com as respectivas radiações de fundo está diretamente relacionada com a sensibilidade da técnica.

6.2.5 Relação entre Intensidades de Raios-X e Concentrações

Uma vez que a perda de como uma excelente aproximação que sua trajetória é retilínea. O perfil de energia ao longo desta linha, em uma amostra de densidade ρ , é conhecido como o poder de freamento da matriz M:

$$S_M(E) = \rho^{-1} \frac{dE}{dx} \quad (7b),$$

Para um determinado constituinte da amostra de número atômico Z, massa atômica A_Z e concentração C_Z , o número de vacâncias na camada K produzidas ao longo de um trecho dx da trajetória é dado por:

$$dN_K = \frac{N_p N_{av} C_Z \sigma_Z(E) dE}{A_Z S_M(E)} \quad (7c),$$

onde N_p é o número de prótons, N_{av} é o número de Avogadro e $\sigma_Z(E)$ é a seção de choque de ionização da camada K para prótons com energia E em uma trajetória x.

O número de raios-X K em cada uma das linhas do espectro pode ser obtido através da fluorescência ω_{KZ} e da fração de intensidade b_{KZ} . Deve-se levar em conta que a intensidade dos raios-X é parcialmente absorvida pela matriz da amostra durante a sua trajetória até o detector (Figura 6a).

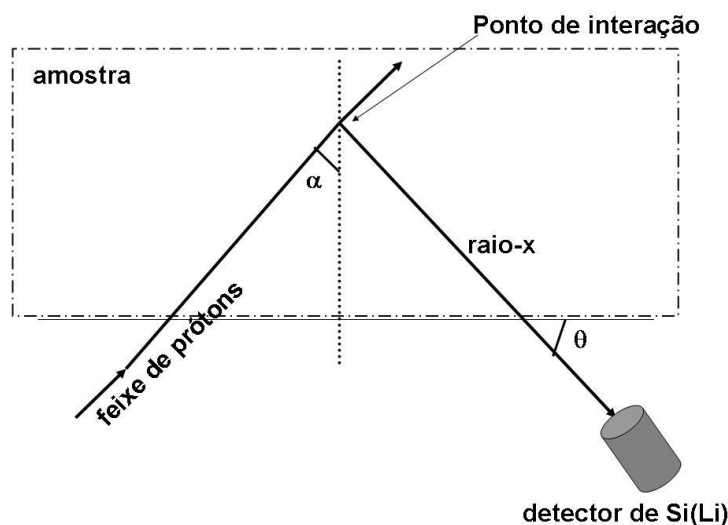


Figura 6 a: Geometria generalizada para análises PIXE de amostras de espessura finita.

A integração sobre todos os segmentos da trajetória do próton fornece a intensidade total $Y(Z)$, ou concentração, de cada raio-X característico resultante da passagem de N_p prótons através da amostra:

$$Y(Z) = \frac{N_{av} \varpi_{KZ} b_{K,Z} t_{K,Z} \varepsilon_z^i (\Omega / 4\pi)}{A_Z} N_p C_Z I_Z(M) \quad (7d),$$

onde:

- $\Omega/4\pi$: fração do ângulo sólido subtendida pelo detector;
- ε_z^i : eficiência intrínseca do detector (depende da geometria do sistema e da eficiência intrínseca do cristal);
- $t_{K,Z}$: transmissão através de qualquer absorvedor interposto entre a amostra e o detector;
- E_0 e E_f : energias de entrada e saída do próton.
- $I_Z(M) = \int_{E_0}^{E_f} \frac{\sigma_Z(E) T_Z(E)}{S_M(E)} dE$

A integral ($I_Z(M)$) em 7d representa os “efeitos de matriz”, como a atenuação dos raios-X produzidos e o freamento dos prótons.

No caso das camadas L e M, $Y(Z)$ torna-se substancialmente mais complicada, devido à existência de três e cinco subcamadas respectivamente. Porém, a equação 7d pode ser facilmente generalizada para esses casos.

A análise para amostras grossas, como citado anteriormente, é feita levando-se em conta que o feixe perde toda a sua energia no interior das mesmas. Desta forma, E_f é um termo que se anula em 7d e os efeitos de matriz devem ser levados em conta em $I_Z(M)$.

A equação 7d pode ser reescrita a partir da definição de $Y_1(Z)$ como o número teórico de contagens de raios-X por unidade de ângulo sólido, por unidade de carga dos prótons (μC) e por unidade de concentração:

$$Y(Z) = Q f_Q \Omega \varepsilon_z^i t_z C_z Y_1(Z) \quad (7e)$$

Nesta equação, Q é a medida experimental da carga do feixe e f_Q é um fator de conversão da carga absoluta. A combinação destes dois fatores com o ângulo sólido Ω , resulta na definição de uma constante experimental capaz de descrever o sistema, H :

$$Y(Z) = H \varepsilon_z^i t_z C_z Y_1(Z) \quad (7f)$$

A análise dos espectros de PIXE e a conseqüente obtenção das concentrações elementares, são baseadas nas equações 7d, 7e, 7f.

6.2.6 Quantificação - Padronização

A conversão das áreas dos picos em concentrações elementares absolutas, poderia ser realizada se todos os parâmetros experimentais fossem determinados. Isto exigiria um rigoroso controle dos mesmos, tornando o trabalho bastante difícil e demorado. Com auxílio de padrões, este procedimento torna-se mais simples e prático.

O procedimento utilizado é chamado de padronização do sistema. Compara-se um espectro qualquer medido com o espectro construído através de um padrão cujas concentrações são certificadas e que, preferencialmente, possui matriz a mais semelhante possível àquela da amostra a ser analisada.

Desta forma, todos os fatores geométricos envolvidos no experimento são incluídos em uma única quantidade que descreve o sistema, H (também chamada de “*fator de padronização*”).

Para obter H (equação 7f), utiliza-se uma amostra padrão, cujas concentrações elementares tabeladas são chamadas de C_V . Após a medida, o espectro é analisado com o software GUPIXWIN, tomando-se o valor “falso” de $H = 1$. A concentração resultante do ajuste com o programa é denominada C_F . A determinação de H é feita através da equação 7g:

$$H = \frac{C_M}{C_F} \quad (7g)$$

Assim, H se torna uma constante de normalização que pode ser utilizada para todos os demais espectros medidos, mantendo as características do arranjo experimental.

Os valores de H dependem da estabilidade do sistema. Desta forma, de tempos em tempos deve-se refazer estes cálculos para garantir a confiabilidade da quantificação.

6.2.6.1 Análises com GUPIXWIN

O programa GUPIXWIN³⁴⁻³⁷ é um programa que foi desenvolvido a partir do GUPIX, software utilizado desde a década de 90 para analisar espectros PIXE.

Através do ajuste simultâneo dos picos do espectro pelo método de mínimos quadrados não-linear, tem-se o cálculo das áreas dos picos e a subsequente conversão das áreas em concentrações elementares através do processo de padronização. A base de dados do programa contém informações sobre as energias das linhas de raios-X e intensidades relativas; seções de choque de produção de raios-X; largura das lorentzianas; poder de freamento e fatores de atenuação para todos os materiais; densidade e peso atômico dos elementos e seção de choque fotoelétrica.

Juntamente com esta base de dados e com parâmetros numéricos correspondentes ao equipamento e experimento, é possível estimar as áreas dos picos do espectro obtido experimentalmente convertendo-as em concentrações elementares.

As etapas de um ajuste com o programa GUPIXWIN já foram explicadas de forma bem detalhada por Iochims⁴⁸ e estão listadas de maneira sucinta abaixo:

- a) No menu *File-New Project* deve-se abrir o espectro medido no formato *.asc;
- b) No menu *Setup* são informados os parâmetros experimentais da medida:
 - i) *Setup* → *Trace or Matrix* → *Trace Element in a known matrix*: a matriz é conhecida (foi medida com RBS) e será informada no menu *Sample*;
 - ii) *Setup* → *Experimental Setup Options*: aqui serão fornecidos os parâmetros experimentais da medida (Figura 7b):
 - (1) A geometria do sistema: ângulo entre o feixe e a normal da amostra (0°) e ângulo entre o raio-X emitido e a normal da amostra (45°);
 - (2) O tipo de íon que foi utilizado, sua respectiva energia (em keV) e a carga total incidente na partícula (medida em μC);
 - (3) Tipo de seção de choque;
 - (4) Detector;
 - (5) *Filter*: Espessura e área dos filtros utilizados entre a amostra e o detector: no nosso sistema é utilizado Mylar com espessura de $364,9\mu\text{m}$ e área do orifício de $3,3003\%$;
 - (6) O fator de padronização H que é composto por arquivos *.HED criados separadamente para cada conjunto de linhas de raio-X (K, L, M).

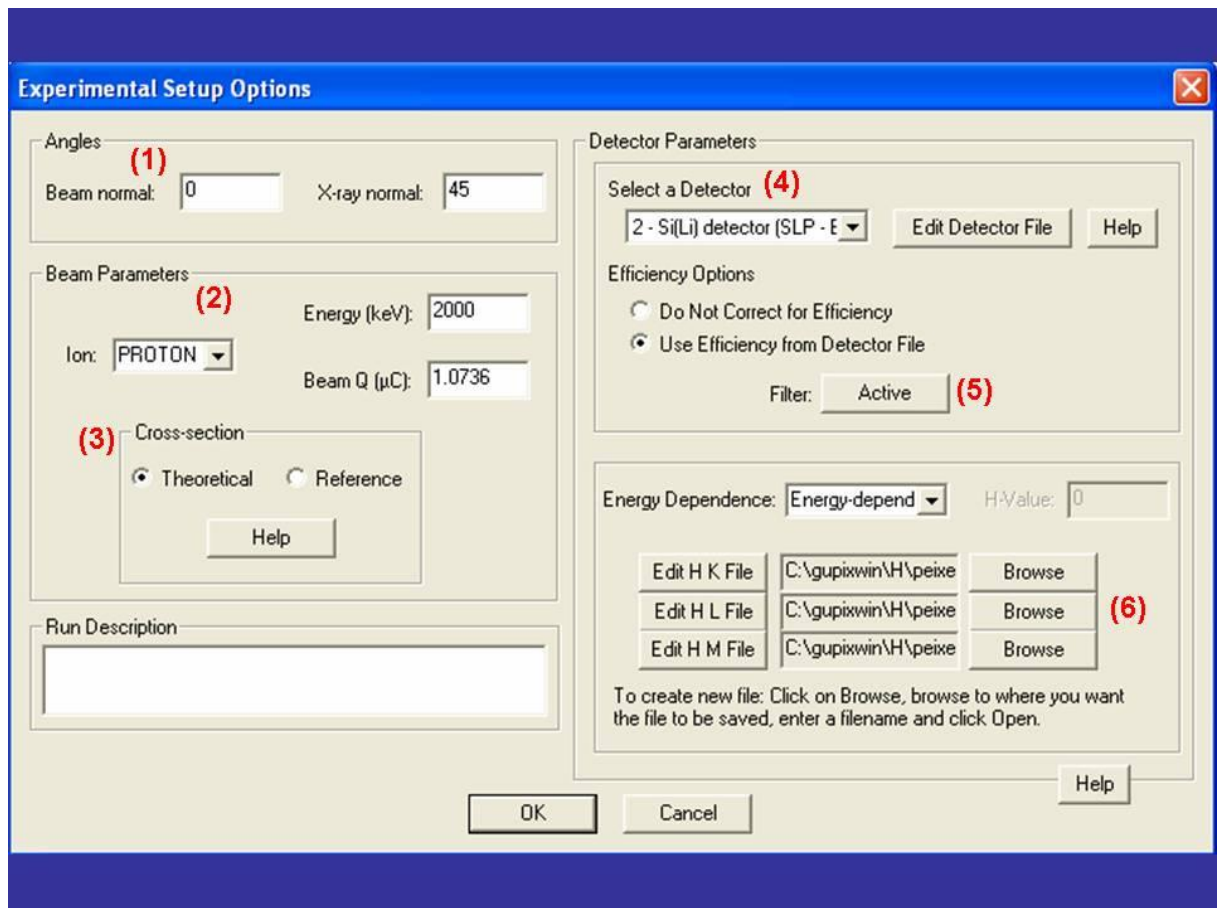


Figura 6 b: Janela do programa GUPIXWIN onde são informados os parâmetros experimentais para o ajuste do espectro PIXE.

c) No menu *Sample*:

i) *Sample structure*: thick (amostra grossa);

ii) *Trace element solution*:

(1) Define matrix: aqui será fornecida a composição elementar da matriz da amostra que foi determinada com RBS.

(2) Define fit elements: aqui deve-se listar todos os elementos que devem ser considerados na simulação, bem como as linhas de raio-X (K, L, M) que devem ser utilizadas para cada um.

d) No menu *Fit* → *Spectrum details*:

i) *Region of fit*: Define-se a região de canais onde deve ser realizado o ajuste;

ii) *Calibration parameters*: Parâmetros A_1 , A_2 , A_3 , A_4 e A_5 . São os parâmetros de calibração e são previamente obtidos através da calibração de energia e de largura. A_3 deve ser nulo, uma vez que a relação canal/energia é linear. Além disso, A_3 e A_5 devem ser fixados.

- iii) *Pile-ups*: optar por *peak and continuum pile-up*, informando a região de ajuste;
 - iv) *Digital background filter*: selecionar a opção *Variable UW,LW*.
- e) Depois da informação dos parâmetros dos itens b, c e d, solicita-se que o programa faça o ajuste através do menu *Gupix* → *Run*.

Os resultados do ajuste são apresentados em *View Stats*, que contém a descrição do arquivo ajustado, as concentrações elementares, limites de detecção (LOD), decisões do programa e incertezas associadas ao ajuste, dentre outras informações. Há também a opção de criar arquivos “csv” e “txt” para os resultados obtidos no menu *Output Manager*.

Os arquivos são gerados no formato de Planilha do Excel com os seguintes nomes:

- PIXCON.csv (tabela de concentrações de cada elemento)
- PIXERR.csv (tabela dos erros do ajuste, expressos em porcentagens)
- PIXLOD.csv (tabela dos valores do limite de detecção)
- PIXDEC.csv (tabela das decisões do programa quanto a presença de cada elemento).

6.2.7 Acurácia

A acurácia dos resultados obtidos por PIXE depende de diversos fatores. Dentre eles pode-se destacar: a preparação da amostra (grau de homogeneidade e suavidade), a natureza e homogeneidade dos padrões, a geometria definida pelos fatores feixe – amostra - detector, a medida de carga incidente na amostra, a eficiência e a função resposta do detector, o ajuste do espectro, a correção dos efeitos de matriz e o banco de dados utilizado na quantificação.

Os padrões utilizados para a obtenção das curvas de calibração do sistema, por exemplo, contém erros associados ao método de preparação. Muitos laboratórios utilizam filmes finos da Micromatter[®] que possuem incerteza da ordem de 5% baseada em determinações gravimétricas. Existem na literatura muitas análises por PIXE de padrões utilizados como referência assim como intercomparações da técnica PIXE com uma variedade de outras técnicas (ICP-MS, ICP-AES) utilizando vários tipos de amostras, como citado na seção 2.6 deste trabalho.

Vale destacar que a precisão ou reprodutibilidade das medidas realizadas por PIXE podem ser afetadas também pela energia do feixe, posição da amostra, integração da corrente, a eficiência e ângulo sólido do detector, entre outros. Logo, a estabilidade desses parâmetros deve ser constantemente monitorada para garantir o mínimo de variabilidade das medidas.

6.2.8 Limites de Detecção

O limite de detecção (LOD - *Limit Of Detection*) é uma das principais características de uma técnica analítica. É analisando o limite de detecção de uma determinada técnica que se decide se esta é aplicável ao estudo ou não.

O LOD depende do próprio sistema de detecção e do alvo analisado. Cada elemento de uma mesma amostra apresentará um limite de detecção distinto dos outros elementos.

A figura 7c ajuda a ilustrar um exemplo de como determina-se o LOD. Nesta figura pode-se observar que o pico da direita está em uma região com pouca radiação de fundo, já o pico da esquerda está completamente levantado por ela. Adota-se, na espectroscopia PIXE, que o valor de LOD é obtido a partir de três desvios-padrão da área de radiação de fundo na região do pico de um determinado elemento. Na figura

abaixo, seria a relação entre as áreas A e B no pico da esquerda e a relação entre as áreas C e D no pico da direita.

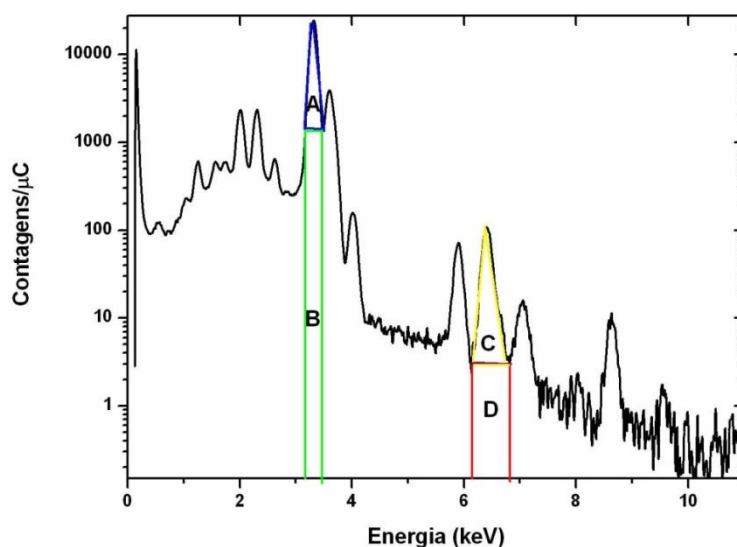


Figura 6 c: Representação ilustrativa do cálculo do limite de detecção de picos (contagens normalizadas pela carga) com diferentes energias (keV). Reproduzido com autorização da referência 44.

Em geral, se os limites de detecção (geralmente expressos em $\mu\text{g/g}$) forem plotados em função do número atômico de cada elemento, observa-se uma curva em forma de “U”. Este comportamento pode ser observado tanto para conjunto de linhas K, quanto para o conjunto de linhas L dos elementos. Gráficos “U” representando estes dois conjuntos de linhas permitem observar que o limite de detecção tem um mínimo entre os números atômicos 20 e 30 para as linhas K, e um mínimo entre 70 e 80 para as linhas L.

A figura 6 d mostra os limites de detecção respectivos as linhas K dos elementos que foram analisados neste trabalho.

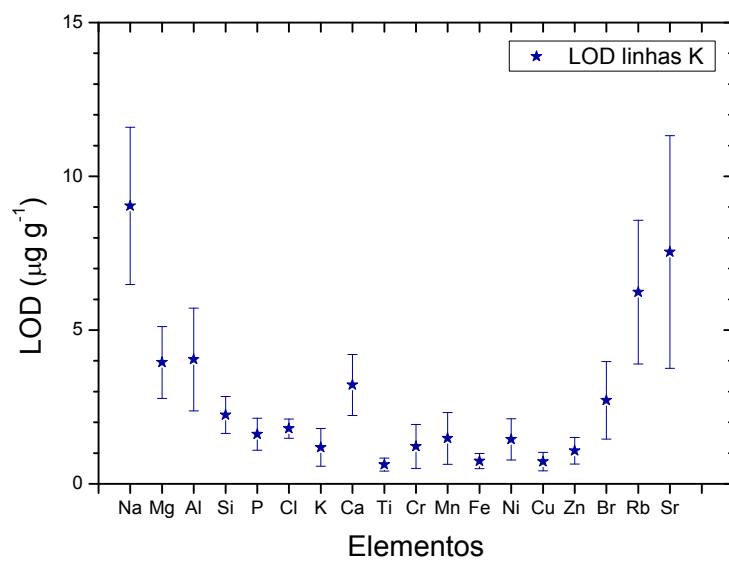


Figura 6 d: Limites de detecção das linhas K dos elementos analisados para as amostras deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. *Codex Alimentarius*: <http://www.inchem.org/pages/jecfa.html>
2. MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Atenção à Saúde, **Guia alimentar para a população brasileira: promovendo a alimentação saudável**, Brasília, 2006.
Link: <http://www.saude.gov.br/nutricao>
3. Dias, J.F.; Fernandez, W.S.; Boufleur, L.A.; Dos Santos, C.E.I.; Amaral, L.; Yoneama, M.L.; Dias, J.F.; *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B, Biomonitoring study of seasonal anthropogenic influence at the Itamambuca beach (SP, Brazil)*, 2009, 267, p1960-1964.
4. De Andrade, V.M.; Da Silva, J.; Da Silva, F.R.; Heuser, V.D.; Dias, J.F.; Yoneama, M.L.; Freitas, T.R.O.; *Environmental and Molecular Mutagenesis, Fish as Bioindicators to Assess the Effects of Pollution in Two Southern Brazilian Rivers Using the Comet Assay and Micronucleous Test*, 2004, 44, p 459-468.
5. <http://www.ban.org/ban-hg-wg/Mercury.ToxicTimeBomb.Final.PDF>
6. http://www.facome.uqam.ca/pdf/cardoso_2002.PDF
7. Holden, A.V.; *Journal of Food Technology, Mercury in fish and shellfish*, a review, 1973, 8, 1-25, *apud* Voegborlo, R.B.; El-Methnani, A.M.; Abedin, M.Z.; *Food Chemistry, Mercury, cadmium and lead content of canned tuna fish*, 1999, 67, p341-345.
8. Inskip, M.J.; Piotrowsiki, J.K.; *Journal of Applied Toxicology, Review of the health effects of methyl mercury*, 1985, 5, 113-133, *apud* Voegborlo, R.B.; El-Methnani, A.M.; Abedin, M.Z.; *Food Chemistry, Mercury, cadmium and lead content of canned tuna fish*, 1999, 67, p341-345.
9. <http://nev.incubadora.fapesp.br/portal/saude/sausedotrabalhador/doencas/metais>
10. <http://www.fda.gov>
11. <http://www.fao.org>
12. <http://www.who.int/en/>
13. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária; *Diário Oficial da União, Poder Executivo, Portaria nº 685, de 27 de agosto de 1998*.
14. Ikem, A.; Egiebor, N.O.; *Journal of Food Composition and Analysis, Assessment of trace elements in canned fishes (mackerel, tuna, salmon, sardines and herrings) marketed in Georgia and Alabama (United States of America)*, 2005, 18, p 771-787.

15. Voegborlo, R.B.; El-Methnani, A.M.; Abedin, M.Z.; *Food Chemistry*, **Mercury, cadmium and lead content of canned tuna fish**, 1999, 67, p341-345.
16. Mustafa, T.; Mustafa, S.; *Food Chemistry*, **Determination of trace metals in canned fish marketed in Turkey**, 2007, 101, p. 1378-1382.
17. Khansari, F.E.; Ghazi-Khansari, M.; Abdollahi, M.; *Food Chemistry*, **Heavy metals content of canned tuna fish**, 2005, 93, p 293-296.
18. Usydus, Z.; Szlinder-Richert, J.; Polak-Juszczak, L.; Kandarska, J.; Adamczyk, M.; Malesa-Cieciewicz, M.; Ruczynska, W.; *Food Chemistry*, **Food of marine origin: Between benefits and potential risks. Part I. Canned fish on the Polish market**, 2008, 111, p 556-563.
19. Ho, R.C.M; Lam, Y.V.; Tan, E.S.L.; Ng, P.M.Y.; Mak, A.; *The Lancet*, **Amnesia, political ambition, and canned tuna**, 2009, 373, No. 9660, p 352.
20. Yallouz, A.; Campos, R.; Louzada, A.; *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **Níveis de mercúrio em atum sólido enlatado comercializado na cidade do Rio de Janeiro**, 2001, 21, p.1-4.
21. Centro de Tecnologia de Embalagem.http://www.cetea.ital.org.br/lab_metalicas.htm
22. Rasmussen, R.S.; Morrissey, M.T.; *Food Chemistry*, **Effects of canning on total mercury, protein, lipid, and moisture content in troll-caught albacore tuna (*Thunnus alalunga*)**, 2007, 101, p 1130-1135.
23. Ganjavi, M.; Ezzatpanah, H.; Givianrad, M.H.; Shams, A.; *Food Chemistry*, **Effect of canned tuna fish processing steps on lead and cadmium contents of Iranian tuna fish**, 2009, "no prelo".
24. Johansson, S.A.E.; Campbell, J.L.; Malmqvist, K.G.; **PARTICLE-INDUCED X-RAY EMISSION SPECTROMETRY (PIXE)**. New York: John Wiley and Sons, 1995.
25. Saitoh, K.; Sera, K.; Gotoh, T.; Nakamura, M.; *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B*, **Comparison of elemental quantity by PIXE and ICP-MS and/or ICP/AES for NIST standards**, 2002, 189, p. 86-93.
26. Giulian, R; Santos, C.E.I dos; Shubeita, S.M.; Silva, L.R.M. da; Dias, J.F.; Yoneama, M.L.; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **Elemental Characterization of Commercial Mate Tea Leaves (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) before and after Hot Water Infusion Using Ion Beam Techniques**, 2007, 55, p 741-746.

27. Santos, C.E.I dos; Silva, L.R.M. da; Boufleur, L.A.; Debastini, R.; Stefenon, C.A.; Amaral, L.; Yoneama, M.L.; Dias, J.F.; *Food Chemistry*, **Elemental characterisation of Cabernet Sauvignon wines using Particle-Induced X-ray Emission (PIXE)**, 2010, v. 121, p. 244-250.
28. Silveira, V.C.; Oliveira, A.P. de.; Sperotto, R.A.; Espindola, L. da S.; Amaral, L.; Dias, J. F.; Cunha, J.B. da.; Fett, J.P.; *Brazilian Journal of Plant Physiology*, **Distinct impact of iron stress on mineral status of two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars**, 2007, v. 19, n. 2, p 127-139.
29. Chu, W.K.; **Backscattering spectrometry**. New York, Academic Press, 1978.
30. Dias, J.F.; Bulla, A.; Yoneama, M.-L.; *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B*, **Charging effects in thick insulating samples**, 2002, v. 189, p 72-76.
31. Shubeita, S.M; Santos, C.E.I dos; Filho, J.L.R; Giulian, R.; Meira, L.; Silva, P.R.; Amaral, L.; Dias, J.F.; Yoneama, M.L.; *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B*, **Residual activity induced by ion bombardment on insulating samples**, 2005, v. 240, p. 297-302.
32. **SIMNRA Manual**, disponível no menu “Help” do programa ou através do site oficial: <http://www.rzg.mpg.de/~mam/>
33. NRCC - National Research Council Canada (NRC – CNRC). **Certified Reference Material DORM-2 (Dogfish Muscle)**.
34. Maxwell, J.A.; Campbell, J.L.; Teesdale, W.J.; *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B*, **The Guelph PIXE software package**, 1989, v. 43, p. 218-230.
35. Maxwell, J.A.; Campbell, J.L.; Teesdale, W.J.; *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B*, **The Guelph PIXE software package II**, 1995, v. 95, p.407-421.
36. Campbell, J.L.; Hopman, T.L.; Maxwell, J.A.; Nejedly, Z.; *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B*, **The Guelph PIXE software package III: Alternative proton database**, 2000, v.170, p. 193-204.
37. **The GUPIXWIN manual and user-guide**, Version 2.1, *GUPIXWIN_Manual.pdf*, disponível para download em: <http://pixe.physics.uoguelph.ca/gupix/about/>
38. Levine, D.M.; Berenson, M.L.; Stephan, D.; **Estatística: Teoria e Aplicações**, LTC Editora, 2000.

39. Sawilowsky, S.S.; *Journal of Modern Applied Statistical Methods*, **Fermat, Schubert, Einstein, and Behrens-Fisher: The probable difference between two means when $\sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$** , 2002, Vol. 1, No 2, p 461-4
40. Cappon, C.J.; Smith, J.C.; *Journal of Applied Toxicology*, **Chemical form and distribution of mercury and selenium in canned tuna, 1982, 2(4), p.181-189**, *apud* Rasmussen, R.S.; Morrissey, M.T.; *Food Chemistry, Effects of canning on total mercury, protein, lipid, and moisture content in troll-caught albacore tuna (Thunnus alalunga)*, 2007, 101, p 1130-1135.
41. Yess, N.J.; *Journal of AOAC International*, Food and Drug Administration survey of methylmercury in canned tuna, 1993, 76(1), p. 36-38, *apud* Rasmussen, R.S.; Morrissey, M.T.; *Food Chemistry, Effects of canning on total mercury, protein, lipid, and moisture content in troll-caught albacore tuna (Thunnus alalunga)*, 2007, 101, p 1130-1135.
42. Kayoumjian, H.H.; Tibian, M.; Najjar, E.; *Lebanese Science Journal*, **Exposure of the Lebanese population to mercury through fishery products and a proposal for a screening standard**, 2001, 2(1), p. 37-44, *apud* Rasmussen, R.S.; Morrissey, M.T.; *Food Chemistry, Effects of canning on total mercury, protein, lipid, and moisture content in troll-caught albacore tuna (Thunnus alalunga)*, 2007, 101, p 1130-1135.
43. Dantas, F.B.H.; Dantas, S.T.; Saron, E.S.; Faria, E.V.; Kiyataka, P.H.M.; *Brazilian Journal of Food Technology*, **Evaluation of DRD cans for tuna fish packaging**, 2008, v. 11, n. 3, p 234-240.
44. Pais, I.; Jones, J.B.Jr.; **The Handbook of Trace Elements**, St. Lucie Press, 2000.
45. Azevedo, G.M.; **Estudo do Poder de Freamento de He, Li, Eu e Bi Canalizados em Alvos de Si Cristalino**, Tese de Doutorado, IF-UFRGS, 2000, capítulos 2 e 3.
46. Santos, J.H.R. dos; **Estudo do Poder de Freamento eletrônico de Íons de He e B Canalizados em Si**, Tese de Doutorado, IF-UFRGS, 1997, capítulos 1 e 2.
47. Yoneama, M.L.; Dias, J.F.. **Espectroscopia por emissão de raios-X induzida por partículas (PIXE)**. Em: Elba Calesso Teixeira; Marçal José Rodrigues Pires; Lillian Waquil Ferraro; Ricardo Luiz Dobrovolski; Terezinha Guerra. (Org.). **Estudos Ambientais em Candiota - Carvão e seus Impactos**. 1ª ed. Porto Alegre: FEPAM, 2004, v. 04, p. 209-215.
48. Santos, C.E.I. dos; **Caracterização Elementar do Vinho Gaúcho**, Dissertação de Mestrado, IF-UFRGS, 2008, capítulo II, seção 2.4. <http://hdl.handle.net/10183/12435>