

## TEOR DE FLUORETOS EM INFUSÕES DE CHÁ VERDE (*Camellia sinensis*)

Márcia Reto, Maria Eduardo Figueira, Helder Mota Filipe e Cristina M. M. Almeida\*

Unidade Farmacologia e Farmacotoxicologia, Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Av. das Forças Armadas, 1600-083 Lisboa, Portugal

Recebido em 7/3/07; aceito em 19/7/07; publicado na web em 26/2/08

FLUORIDE CONTENT IN GREEN TEA INFUSIONS (CAMELLIA SINENSIS). The aim of this work was to study the influence of green tea consumption on fluoride ingestion. The extraction conditions of fluorides from green tea infusions were defined and nine brands of green tea available in Portugal were analyzed. The quantification of fluorides in the green tea was preceded by the implementation and validation of the potentiometric method (commercial fluoride selective electrode). The concentration of fluorides in the samples ranged from 0.8 to 2.0 mg L<sup>-1</sup>.

Keywords: fluoride; green tea; infusion.

### INTRODUÇÃO

O chá tornou-se uma das bebidas mais populares no mundo devido não só ao seu sabor e aroma agradáveis mas também aos efeitos benéficos para a saúde. É uma bebida de composição química muito variada e embora os efeitos benéficos estejam predominantemente associados ao seu teor em catequinas, o chá também é rico em vários minerais e oligoelementos essenciais para a saúde, como por exemplo, os fluoretos. Vários estudos têm sido efectuados com o objectivo de determinar o teor destes elementos nas infusões e nas folhas de chá verde<sup>1-6</sup>.

Os fluoretos não são essenciais para o crescimento e o desenvolvimento humanos, encontrando-se no corpo humano em pequenas concentrações (2,6 mg num adulto) essencialmente nos dentes e ossos (99%)<sup>7</sup>. No entanto, são benéficos na prevenção da cárie dentária quando ingeridos na concentração de 0,05 mg/kg de massa corporal por dia. Os fluoretos fortalecem e favorecem a reparação (remineralização) do esmalte e dentina, não só porque reduzem a solubilidade destes compostos em meio ácido, mas também, porque reduzem a capacidade bacteriana de produzir ácidos<sup>8</sup>. De acordo com os relatórios da Organização Mundial de Saúde (OMS) as cáries dentárias constituem um importante problema de saúde pública nos países mais desenvolvidos, onde afectam cerca de 60-90% das crianças em idade escolar e um número representativo da população adulta. Para combater este problema, e uma vez que os fluoretos são reconhecidos como a medida mais eficaz na prevenção da cárie dentária, a OMS recomenda que este elemento seja adicionado à água, ao leite ou ao sal, de modo a permitir o acesso de toda a população aos fluoretos, sem no entanto, alterar os seus hábitos alimentares<sup>9</sup>.

A maioria dos alimentos apresenta um teor baixo em fluoretos (inferior a 0,05 mg/100 g). As principais fontes alimentares de fluoretos incluem o chá e os peixes marinhos, principalmente os que são consumidos com as espinhas (por exemplo, sardinhas). Deste modo, os alimentos contribuem geralmente apenas com 0,3-0,6% da dose diária ingerida de fluoretos<sup>7</sup>.

A maioria das plantas que se desenvolvem em solos ricos em fluoretos não o absorvem uma vez que no solo estes são convertidos em sais insolúveis de cálcio, no entanto, a *Camellia sinensis* de-

envolve-se em solos relativamente ácidos e absorve os fluoretos do solo acumulando-os nas suas folhas<sup>10-12</sup>. A concentração em fluoretos nas folhas velhas e maduras é maior comparativamente ao de outras partes da planta<sup>10,12,13</sup>. Assim, a concentração de fluoretos poderá ser indicativo da maturidade da folha.

Uma quantidade substancial deste elemento liberta-se durante a infusão, sendo, por isso, o chá considerado uma boa fonte de fluoretos<sup>14,15</sup>. O teor total de fluoretos nas folhas de chá verde varia entre 217-344 mg/kg, enquanto que a concentração na infusão se encontra entre 0,73-3,46 mg L<sup>-1</sup><sup>14,16</sup>. Durante a infusão cerca de 25 a 84% do teor de fluoretos existente na folha é libertado para o líquido<sup>14</sup>. Deste modo, o chá pode ser um modo efectivo de fornecimento de fluoretos na cavidade bucal<sup>17</sup>.

Uma ingestão apropriada de fluoretos é benéfica (3-4 mg/dia para adultos), uma vez que previne as cáries dentárias, contudo, um consumo excessivo pode ter efeitos adversos, como por exemplo, a fluorose<sup>8</sup>. A fluorose dentária é um distúrbio de formação dentária provocada pela ingestão prolongada de fluoretos, tendo como consequência, uma opacidade do esmalte<sup>18</sup>.

Em países como China, Formosa e Índia, onde o chá é a bebida de maior consumo e onde é preparado com água natural ou artificialmente fluorada, têm sido desenvolvidos estudos para determinar o consumo diário de flúor por parte das populações, de modo a controlar os efeitos inerentes à ingestão excessiva de fluoretos<sup>12,14,16,19</sup>. Nos países ocidentais o consumo excessivo de fluoretos deve-se essencialmente à ingestão acidental de pastas dentrificas, consumo de alimentos infantis e bebidas preparadas com águas fluoretadas e certas bebidas e alimentos com elevados teores de fluoretos<sup>8</sup>.

O eléctrodo seletivo do íon fluoreto é muitas vezes utilizado para quantificação de fluoretos em bebidas. Este eléctrodo tem como membrana sensível um cristal de fluoreto de lantânio. Quando este está em contacto com uma solução padrão ou amostra contendo íões fluoreto estabelece-se uma diferença de potencial através do cristal, a qual está relacionada com a respectiva concentração do íon fluoreto. A medição é influenciada pela força iónica, pelo pH e por espécies catiónicas polivalentes.

Os fluoretos formam complexos com os catiões polivalentes, como o cálcio, magnésio, alumínio e ferro<sup>20</sup>. A taxa de formação destes complexos depende do pH da solução, da concentração de íões fluoreto e da presença de outros compostos complexantes. A formação de ácido

\*e-mail: calmeida@ff.ul.pt

fluorídrico (HF) em condições acídicas reduz a concentração de iões fluoreto em solução. A leitura a pH 5 – 7 evita esta interferência. A presença de um agente complexante mais forte que o fluoreto, como ácido trans 1,2-diaminociclo-hexano-N,N,N',N' tetracético, um dos componentes da solução tampão, complexa preferencialmente os catiões interferentes e liberta os iões fluoreto em solução. Deste modo, a determinação de fluoretos é sempre efectuada após uma diluição em partes iguais com uma solução tampão e estabilizadora da força iónica<sup>20</sup>.

De modo a avaliar a contribuição do chá para a ingestão diária deste elemento estudou-se o teor de fluoretos presente nas infusões de chá verde. A quantificação do teor de fluoretos no chá verde foi precedida pela implementação e validação do método potenciométrico (eléctrodo seletivo comercial).

## PARTE EXPERIMENTAL

### Amostras

Selecionaram-se nove marcas de chá comercializadas em Portugal em função de três critérios: volume de vendas, preço (o mais caro e o mais barato), os que apresentam descritos a indicação terapêutica (folheto informativo) e o mais representativo das grandes superfícies (hipermercados). Os vários chás foram adquiridos em lojas de produtos naturais, hipermercados e farmácias da região de Lisboa.

As diferentes marcas estão representadas por siglas as quais permitem a identificação das amostras ao longo do trabalho. As amostras TN, TV, T, B, F e D são vendidas em saquetas e as amostras G, M e S são comercializadas em folha inteira. Todas as amostras foram analisadas em triplicado.

### Reagentes

As soluções padrão de fluoretos foram preparadas a partir de fluoreto de sódio (Merck, Alemanha). A solução tampão e estabilizadora da força iónica TISAB (“Total Ionic Strength Adjustment Buffer”) foi preparada de acordo com os requisitos do Standard Methods<sup>20</sup> utilizando o ácido trans 1,2-diaminociclo-hexano-N,N,N',N' tetracético (CDTA), o hidróxido de sódio (Merck, Alemanha) e o cloreto de sódio (Panreac, Espanha).

As infusões e reagentes foram preparados com água do tipo Milli-Q (Mili Q System, Millipore).

### Equipamento e material

O teor de fluoretos foi determinado utilizando um eléctrodo seletivo de fluoretos (Mettler Toledo), um eléctrodo de referência Ag/AgCl (Mettler Toledo) e um potenciómetro, (GLP 2, Crison). As amostras de chá foram preparadas em Erlenmeyers de rolha esmerilhada com a capacidade de 300 mL e agitadas em placas de agitação (Cole Parmer).

### Preparação da amostra

Todas as infusões de chá verde foram preparadas no próprio dia da análise.

Num erlenmeyer de 300 mL pesaram-se  $1,50 \pm 0,05$  g de chá (folhas ou o conteúdo de uma saqueta), adicionaram-se 250 mL (o equivalente a uma chávena de chá) de água desmineralizada fervente ( $100 \pm 5$  °C) e tapou-se o erlenmeyer com uma rolha para diminuir as perdas de água. Após 10 min de infusão, filtrou-se a infusão para outro erlenmeyer. A relação massa de chá/volume de água foi determinada com base na informação descrita para a preparação dos vários tipos de chá. Todas as amostras foram preparadas de modo a simular a preparação efectuada em casa pelos consumidores.

### Determinação de fluoretos

O teor de fluoretos foi determinado potenciometricamente utilizando um eléctrodo seletivo de fluoretos. As amostras de chá ou das soluções padrão foram colocadas sobre a placa de agitação (Cole Parmer) com agitador magnético, após terem sido diluídas (1:1) com solução tampão TISAB (este tampão permite ajustar a força iónica e o pH do meio e eliminar a interferência dos catiões, principalmente o dos catiões polivalentes). Depois de mergulhar os eléctrodos, efectuou-se a leitura do potencial (mV) das amostras ao fim de 3 min sob agitação (tempo necessário para que o valor da leitura seja constante). A concentração do íon fluoreto nas amostras foi determinada a partir da curva de calibração (mV vs logaritmo da concentração).

### Otimização do método de ensaio e avaliação de desempenho

O desempenho do método pode ser avaliado através do estudo e conhecimento de parâmetros analíticos característicos, tais como: intervalo de linearidade; precisão; exatidão; limite de detecção; limite de quantificação; seletividade/especificidade.

Para determinar o intervalo de linearidade foi construída uma curva de calibração, processo pelo qual se relacionou a resposta do sistema (sinal instrumental) com soluções de concentração crescente em fluoretos. Com este objectivo, analisaram-se 14 soluções de fluoretos com uma concentração entre 0,06-10 mg L<sup>-1</sup>. Analisaram-se os resultados pelo cálculo da linha de regressão pelo método dos mínimos quadrados.

Embora uma análise inicial possa ser feita com base na inspecção visual do gráfico ( $y = bx + a$ ) e na determinação do valor de R<sup>2</sup> (coeficiente de determinação), uma análise completa requer os cálculos do desvio padrão residual ( $S_{y/x}$ ), desvio padrão do método ( $S_m$ ), desvio padrão do declive ( $S_b$ ), desvio padrão da ordenada na origem ( $S_a$ ) e do coeficiente de variação do método ( $CV_m$ )<sup>21</sup>.

O desvio padrão do método é o parâmetro que permite ao analista verificar a qualidade do seu trabalho enquanto que o coeficiente de variação do método permite comparar diferentes calibrações e diferentes métodos<sup>21</sup>.

Este primeiro teste de linearidade deve ser bem interpretado, pois os coeficientes de determinação são bons indicadores de correlação, mas não necessariamente de linearidade. Sendo assim é necessário determinar em paralelo o valor teste (PG), o qual é comparado com o valor tabelado da distribuição F de Snedecor/Fisher (ISO 8466-1, teste de Fisher/Snedecor ou teste Mandel), de acordo com o número de graus de liberdade em causa<sup>21</sup>: a) se  $PG \leq F$ : a função de calibração polinomial não conduz a um ajustamento significativamente melhor, e por isso, a função de calibração é linear; b) se  $PG > F$ : a função de calibração é não linear e por isso a gama de trabalho deve ser reduzida tanto quanto possível de forma a cumprir a alternativa a). Caso não seja possível, deverá ser utilizada uma função de calibração não linear.

Após definir o intervalo de linearidade do método determinaram-se os respectivos limiares analíticos (limite de detecção e limite de quantificação).

Em termos quantitativos, o conceito de limite de detecção corresponde à concentração mínima que é possível distinguir do branco, isto é, de uma amostra que contém a mesma matriz mas não contém o analito. O limite de detecção (LD) pode ser calculado do seguinte modo<sup>21-23</sup>:

$$LD = 3 \times S_{x_0}$$

em que  $S_{x_0}$  é o desvio padrão correspondente a várias leituras do branco ou da solução com concentração mais baixa da gama de linearidade<sup>21</sup>.

Como o método analítico envolve uma calibração linear, o limite de detecção também pode ser calculado através do desvio padrão residual da curva de calibração, através da seguinte Equação<sup>21-23</sup>:

$$L.D. = \frac{3,3 \times S_{y/x}}{b}$$

em que:  $S_{y/x}$  é o desvio padrão residual da curva de calibração;  $b$  é o declive da mesma.

O desvio padrão residual da curva de calibração é determinado através da seguinte expressão:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y}_i)^2}{N - 2}}$$

sendo:  $N$  – número de padrões de calibração;  $y_i$  – sinal obtido para um padrão de determinada concentração;  $\bar{y}_i$  – sinal estimado pela função de calibração linear para um padrão da mesma concentração.

O limite de quantificação por sua vez, corresponde à mais pequena concentração medida a partir da qual é possível a quantificação do analito, com uma determinada exatidão e precisão. Tal como descrito para o limite de detecção, como o método analítico envolve a utilização de uma calibração linear, o limite de quantificação pode ser calculado através do desvio padrão residual da curva de calibração, de acordo com a equação seguinte<sup>21-23</sup>:

$$L.Q. = \frac{10 \times S_{y/x}}{b}$$

em que:  $S_{y/x}$  é o desvio padrão residual da curva de calibração;  $b$  é o declive da mesma.

Para avaliar o efeito de matriz, fortificaram-se amostras de chá com concentrações conhecidas de fluoretos e determinou-se a percentagem de recuperação (Rec, %), de acordo com a equação seguinte:

$$Rec = \frac{C_R V_R - C_A V_A}{C_P V_P} \times 100$$

em que:  $C_R$  – concentração do analito na amostra fortificada;  $V_R$  – volume de amostra do ensaio de recuperação ( $V_A + V_P$ );  $C_A$  – concentração do analito na amostra não fortificada;  $V_A$  – volume de amostra utilizada no ensaio de recuperação;  $C_P$  – concentração do padrão de analito utilizado para fortificar a amostra;  $V_P$  – volume de padrão de analito utilizado no ensaio de recuperação.

Este ensaio permite-nos, avaliar de forma indirecta e na ausência de materiais de referência certificados, a exatidão do método em causa e a seletividade do próprio método<sup>22</sup>.

Diz-se que um método é específico quando permite discriminar o analito relativamente a outras substâncias, eventualmente presentes na amostra a analisar, ou seja, quando oferece garantias que

a grandeza medida provém apenas do analito. Por isso, é necessário averiguar a possível interferência de outras substâncias eventualmente presentes na amostra.

Na prática, este parâmetro pode ser avaliado pela realização de testes de recuperação e pela análise de padrões puros ou quantidades conhecidas de possíveis interferências.

A seletividade de um método define-se como a capacidade de identificar e distinguir um analito em particular numa mistura complexa sem interferência dos outros componentes.

Assim, um método analítico pode ser considerado específico e seletivo quando se verificar que as taxas de recuperação são próximas de 100%<sup>22</sup>.

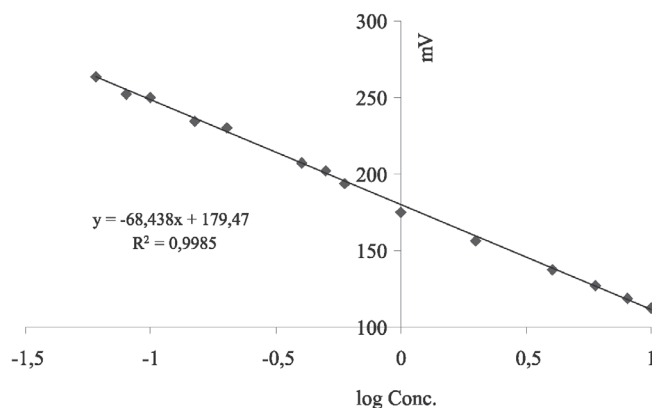
Para avaliar a precisão dos resultados procedeu-se à análise de duplicados, tendo como critério de aceitação uma diferença de duplicados  $\leq 10\%$ , de acordo com a seguinte equação:

$$DD (\%) = \frac{|X_1 - X_2|}{Média (X_1, X_2)} \times 100$$

em que:  $X_1$  – resultado obtido para uma dada amostra;  $X_2$  – resultado obtido para o ensaio duplicado da mesma amostra.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 e a Tabela 1 apresentam os resultados referentes à implementação e otimização das condições de análise.



**Figura 1** - Curva de calibração dos fluoretos (mV vs log da concentração) e respectiva equação da recta ( $y=bx+a$ ). (Concentração – mg/L)

Como podemos observar (Figura 1) a função de calibração dos fluoretos apresenta uma boa correlação no intervalo entre -1,2 (0,06 mg L<sup>-1</sup>) e 1 (10 mg L<sup>-1</sup>). O método é linear,  $R^2=0,9985$  e  $PG < F$  (valor tabelado de Fisher/Snedecor)<sup>21</sup>.

O limite de detecção (0,01 mg L<sup>-1</sup>) e o limite de quantificação (0,05 mg L<sup>-1</sup>) permitem a análise de fluoretos no chá.

Para avaliar o efeito da matriz adicionaram-se a 24 mL de cada uma das amostras G, B e TN e 1 mL da solução padrão de fluoretos

**Tabela 1.** Otimização do método potenciométrico (eléctrodo seletivo) para a análise de fluoretos. Dados relativos à curva de calibração (mV vs logaritmo da concentração) e limiares analíticos

Intervalo linearidade (mg L <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	N	CV (%)	a	EP(a)	b	EP(b)	PG	F	LD	LQ
										(mg L <sup>-1</sup> )	
0,06-10	0,9985	14	1,4	179	0,57	-68,4	0,75	1,8	4,8	0,01	0,05

$R^2$  = coeficiente de determinação;  $N$  = número de pontos da curva;  $CV$  = coeficiente de determinação do método;  $EP(a)$  = erro padrão da ordenada na origem;  $b$  = declive;  $EP(b)$  = erro padrão do declive;  $PG$  = Valor teste;  $F$  = valor tabelado de Snedecor/Fisher (1; 11; 0,05);  $LD$  = limite de detecção;  $LQ$  = limite de quantificação

com a concentração de 10 mg/L. As interferências de matriz estão dentro dos critérios de aceitação deste tipo de método (80-120%)<sup>23</sup>, uma vez que as percentagens de recuperação dos fluoretos nas infusões variaram entre os 103 e os 110% (Tabela 2).

**Tabela 2.** Recuperação dos fluoretos nas várias infusões de chá verde

Chá verde N=3	TV	TN	T	D	F	B	M	S	G
Rec (%)	108	106	107	103	104	110	109	104	106

Os resultados obtidos são precisos, dado que a diferença entre duplicados foi sempre inferior a 10% (3,5-9,6%)<sup>23,24</sup>.

Após otimização das condições de análise procedeu-se à quantificação dos fluoretos nas infusões, cujos resultados estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Concentração de fluoretos nas infusões de chá verde e respectivos desvios padrão (DP)

Chá verde (N=3)	F (mg L <sup>-1</sup> ± DP)	Chá verde (N=3)	F (mg L <sup>-1</sup> ± DP)
TV	1,4 ± 0,2	B	1,1 ± 0,1
TN	1,1 ± 0,1	M	0,90 ± 0,1
T	1,3 ± 0,1	S	0,80 ± 0,1
D	1,2 ± 0,1	G	2,1 ± 0,2
F	1,0 ± 0,1		

Os valores de fluoretos variam entre 0,80-2,1 mg L<sup>-1</sup>, valores similares aos obtidos por Fung (1,65-1,83 mg L<sup>-1</sup>), Chan (0,34-1,43 mgL) e Wong (0,6-1,9 mg L<sup>-1</sup>)<sup>10,14,16</sup>. Estes autores também utilizaram o método potenciométrico com eléctrodo seletivo de fluoretos.

As diferenças observadas entre as amostras analisadas são estatisticamente significativas (p<0,001).

No entanto e como a quantidade de substâncias extraídas durante a preparação da infusão depende, entre outros factores, da relação massa de amostra/volume de água, temperatura, tempo e agitação, torna-se por vezes difícil comparar os resultados dos diversos estudos. As diferenças observadas entre os nossos valores e os descritos na literatura, poderão dever-se a esses factores.

De acordo com Gulati *et al.*<sup>15</sup> a extracção de fluoretos é menor nos chás preparados com folhas inteiras do que os preparados com a folha moída, como é o caso das saquetas. Esta afirmação levaria a pensar que os teores de fluoretos seriam superiores nas amostras TN, TV, D, T, F e B, no entanto a amostra que possui um teor mais elevado é a amostra G, preparada com folha inteira, mas de origem completamente distinta das restantes. Assim, o tipo de solo onde a planta se desenvolve e a idade da folha poderá ter uma maior influência no teor de fluoretos existentes na infusão de chá, do que o seu grau de moagem (folha inteira vs saquetas).

Devido aos valores elevados de alumínio e fluoretos presentes nas folhas de chá, estão a ser realizados estudos sobre o efeito da adição de sais de cálcio no solo na diminuição da absorção destes compostos pela planta, sem no entanto afectar o seu crescimento. O cloreto de cálcio parece ser o sal mais indicado<sup>11,14</sup>.

Lu *et al.*<sup>25</sup> observaram que o teor de fluoretos aumenta à medida que a qualidade do chá diminui. Estes autores sugerem que o teor deste elemento presente na folha seja utilizado como indicador de qualidade. Esta comparação do teor de fluoretos *versus* qua-

lidade do chá não foi efectuada uma vez que para os chás estudados não existia qualquer referência à sua qualidade.

## CONCLUSÕES

A dose diária tolerável de fluoretos é de 10 mg. Sendo assim, seria necessário consumir cerca de 4,8 a 12,5 L das infusões das amostras de chá verde analisadas neste trabalho, para ocorrerem casos de fluorose, isto sem contarmos com outras fontes de fluoretos.

Uma vez que as infusões apresentam concentrações de fluoretos entre 0,8-2,0 mg L<sup>-1</sup>, o seu consumo pode contribuir para colmatar as necessidades diárias (3-4 mg) neste elemento, especialmente em países como Portugal onde a água da rede de abastecimento tem valores baixos de fluoretos. Por outro lado, nos países onde a água é artificialmente ou naturalmente fluorada, a ingestão de fluoretos é mais elevada e o consumo de chá pode contribuir para um consumo excessivo deste composto<sup>26</sup>.

## AGRADECIMENTOS

A todos os colaboradores do Laboratório de Hidrologia e Bromatologia da Faculdade de Farmácia de Lisboa, pela disponibilidade dispensada para a realização deste trabalho.

## REFERÊNCIAS

- Powell, J. J.; Burden, T. J.; Thompson, R. P. H.; *Analyst* **1998**, *123*, 1721.
- Xie, M. Y.; von Bohlen, A.; Klockenkämper, R.; Jian, X. H.; Günther, K.; *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* **1998**, *207*, 31.
- Wrobel, K.; Wrobel, K.; Urbina, E. M.; *Biol. Trace Elem. Res.* **2000**, *78*, 271.
- Matsuura, H.; Hokura, A.; Katsuki, F.; Itoh, A.; Haraguchi, H.; *Anal. Sci.* **2001**, *17*, 391.
- Fernandez-Caceres, P. L.; Martin, M. J.; Pablos, F.; Gonzalez, A. G.; *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 4775.
- Costa, L. M.; Gouveia, S. T.; Nóbrega, J. A.; *Anal. Sci.* **2002**, *18*, 313.
- <http://pi.oregonstate.edu/infocenter/index.html>, acessada em Novembro 2005.
- ADA Journal Position of the American Dietetic Association; *J. Am. Diet. Assoc.* **2005**, *105*, 1620.
- Jones, S.; Burt, B. A.; Petersen, P. E.; Lennon, M. A.; *Bull. World Health Organ.* **2005**, *83*, 670.
- Wong, M. H.; Fung, K. F.; Carr, H. P.; *Toxicol. Lett.* **2003**, *137*, 111.
- Ruan, J.; Ma, L.; Shi, Y.; Han, W.; *Ann. Bot.* **2004**, *93*, 97.
- Shu, W. S.; Zhang, Z. Q.; Lan, C. Y.; Wong, M. H.; *Chemosphere* **2003**, *52*, 1475.
- Ruan, J.; Ma, L.; Shi, Y.; Han, W.; *J. Sci. Food Agri.* **2003**, *83*, 1342.
- Fung, K. F.; Zhang, Z. Q.; Wong, J. W. C.; Wong, M. H.; *Environ. Pollut.* **1999**, *104*, 197.
- Gulati, P.; Singh, V.; Gupta, M. K.; Vaidya, V.; Dass, S.; Prakash, S.; *Sci. Total Environ.* **1993**, *138*, 213.
- Chan, J. T.; Koh, S. H.; *Caries Res.* **1996**, *30*, 88.
- Simpson, A.; Shaw, L.; Smith, A. J.; *J. Dentistry* **2001**, *29*, 15.
- Browne, D.; Whelton, H.; O'Mullane, D.; *J. Dent.* **2005**, *33*, 177.
- Lung, S.-C. C.; Hsiao, P.-K.; Chiang, K.-M.; *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.* **2003**, *13*, 66.
- Cleresci, L. S.; Greenberg, A. E.; Eaton, A. D.; *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, APHA-AWWA-WEF: Washington, DC, 1998, Part 3030, 3111, 3114, 3500-Na, 3500-K and 4500-F.
- ISO 8466-1; *Water quality - Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics, Part I: Statistical evaluation of the linear calibration function*, 1990.
- USP - The United States Pharmacopeia, *USP 26*, <1225> *Validation of Compendial Methods*, 2002.
- RELACRE - Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal; *Guia RELACRE 13: Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química*, Lisboa, 1996.
- Ministério do Ambiente e do Ordenamento do Território, Decreto-Lei nº 243/2001 de 5 de Setembro; *Diário da República - I Série A*.
- Lu, Y.; Guo, W. F.; Yang, X. Q.; *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 472.
- Cao, J.; Sha, F. L.; Liu, J. W.; Li, Y.; *Food Chem.* **2004**, *88*, 233.