

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

CHRISTIANE ROMANELLI ROCHA

**Desenvolvimento de método para análise de leite por
espectrometria de fluorescência de raios X por reflexão total**

Belo Horizonte

2015

UFMG-ICEx/DQ. 1058^a

D. 578^a

CHRISTIANE ROMANELLI ROCHA

**Desenvolvimento de método para análise de leite por
espectrometria de fluorescência de raios X por reflexão total**

Dissertação apresentada ao
Departamento de Química do Instituto de
Ciências Exatas da Universidade Federal
de Minas Gerais, como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em
Química – Química Analítica.

Belo Horizonte

2015

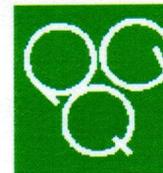
R669d Rocha, Christiane Romanelli
2015 Desenvolvimento de método para análise de leite por
D espectrometria de fluorescência de raios X por
reflexão total/ Christiane Romanelli Rocha. 2015.
[viii], 57f. : il.

Orientadora: Clésia Cristina Nascentes.
Coorientador: Letícia Malta Costa.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Minas Gerais. Departamento de Química.
Inclui bibliografia.

1. Análise espectral - Teses 2. Química analítica -
Teses 3. Espectrometria de absorção atômica - Teses I.
Nascentes, Clésia Cristina, Orientadora II. Costa,
Letícia Malta, Coorientador III. Título.

CDU 043

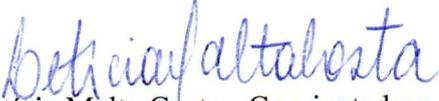


**"Desenvolvimento de Método para Análise de Leite por Espectrometria de
Fluorescência de Raios-x por Reflexão Total"**

Christiane Romanelli Rocha

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Profa. Clésia Cristina Nascentes - Orientadora
UFMG


Profa. Leticia Malta Costa - Coorientadora
UFMG


Profa. Cláudia Carvalhinho Windmüller
UFMG


Dra. Juliana Alves dos Santos Oliveira
UFMG

Belo Horizonte, 24 de fevereiro de 2015.

Agradecimentos

A Deus, que está sempre presente em minha vida

À Professora Clésia Cristina Nascentes pela amizade, paciência, compreensão e pelos ensinamentos e orientação na realização deste trabalho.

À professora Letícia Malta Costa pela co-orientação, pelos ensinamentos e aconselhamentos durante o trabalho.

À minha família por todo amor, compreensão e apoio incondicional durante esta trajetória.

Ao Lanagro/MG e em especial aos colegas do LEI - Laboratório de Elementos Inorgânicos pela amizade, apoio e compreensão.

Aos colegas do laboratório 157, pela convivência e momentos de aprendizado e descontração.

Aos professores do Departamento de Química da UFMG que contribuíram para minha formação.

E a todos que de alguma forma contribuíram para esta conquista...

MUITO OBRIGADA!

Resumo

Neste trabalho foi realizado um estudo em que amostras de leite UHT comercial de diferentes teores de gordura (integral, semidesnatado e desnatado) e leites especiais com baixa lactose e enriquecidos com cálcio foram coletadas a fim de se fazer uma comparação e estabelecer uma possível correlação entre o tipo de leite e as concentrações de P, S, K, Ca, Cu, Zn e Br obtidas através da técnica analítica de fluorescência de raios X por reflexão total (TXRF). Para isso, foi realizada primeiramente, uma otimização para a escolha do melhor elemento para atuar como padrão interno, bem como a sua concentração ótima e o tempo de leitura que fornece os melhores valores de recuperação dos analitos. A configuração de melhor resposta foi a que utilizou o Y na concentração de 10 mg/L com um tempo de leitura de 250 segundos. Dessa forma, foi realizada a análise de amostras digeridas em forno de micro-ondas com HNO_3 e H_2O_2 . Na avaliação dos resultados uma matriz de dados foi construída para a aplicação do método multivariado de Análises de Componentes Principais (PCA) que mostrou que não ocorre uma separação efetiva dos tipos de leite analisados, mas pode ser observado um agrupamento maior dos leites integrais e que está relacionado com teor mais elevado de Cu e Br.

Na segunda parte do trabalho, um método foi desenvolvido para a determinação de chumbo em leite bovino cru, de forma a atender ao regulamento nº 1881 de 2006 da Comunidade Europeia e CODEX STAN 193-1995 de 2010 que estabelecem 20 $\mu\text{g/L}$ como limite máximo permitido de chumbo em leite. Devido à baixa concentração permitida, foi necessário a utilização do procedimento de pré-concentração conhecido como extração em ponto nuvem (EPN), em que foi utilizado o O,O-dietilditiofosfato de amônio (DDTP) como complexante e o Triton X-114 como surfactante. Como o leite cru é uma matriz muito complexa e possui alto teor de gordura, foi necessário fazer a digestão ácida das amostra antes da extração em ponto nuvem. Foi realizada uma otimização da etapa de pré-concentração do Pb por meio de um planejamento composto central, variando-se os volumes dos reagentes utilizados no procedimento. A veracidade e a precisão do método foram estudadas analisando-se amostras dopadas em três diferentes concentrações de chumbo: 20, 50 e 100 $\mu\text{g/L}$. O método apresentou valores entre 80,8 e 112 % para a recuperação, e entre 7 e 10 % para o desvio padrão, estando dentro das faixas aceitáveis estabelecidas pelo Regulamento 657/2002 da Comunidade Europeia. Os valores médios para os limites de detecção obtidos para as amostras foram de 2,0; 4,5 e 5,8 $\mu\text{g/L}$ para as concentrações de 20, 50 e 100 $\mu\text{g/L}$, respectivamente. O fator de pré-concentração calculado ficou entre 4 e 5 vezes.

Palavras-chave: Leite. Pré-concentração. Extração em ponto nuvem. Fluorescência de raios X. TXRF.

Abstract

This work represents a study in which commercial UHT milk samples with different levels of fat (whole, semi-skimmed and skimmed) and special milk with low lactose and calcium-fortified were collected in order to make a comparison and establish a possible correlation between the milk type and the concentrations of P, S, K, Ca, Cu, Zn and Br obtained from the analytical technique Total Reflection X-Ray Fluorescence (TXRF). For this it was first performed an optimization to select the best element to act as internal standard, as well as its optimal concentration and the analysis time that provides the best recovery values of the analytes. The configuration of best response was that used Y with concentration of 10 mg/L with an analysis time of 250 seconds. Thus, analysis of samples digested in a microwave oven using HNO_3 and H_2O_2 was performed. In evaluation of results, a data matrix was constructed for the application of multivariate method Principal Component Analysis (PCA), which showed that there is no effective separation of the different analyzed milk type, but it can be observed a larger group of whole milk that is related to higher content of Cu and Br.

In the second part of this study, a method was developed for lead determination in bovine raw milk, in order to attend the Commission Regulation (EC) No 1881/2006 and CODEX STAN 193-1995 2010 that establish 20 $\mu\text{g/L}$ as ceiling allowed of lead in milk. Due to the low concentration allowed, the use of preconcentration technique known as Cloud Point Extraction (CPE) was required, in which was used the ammonium O,O-diethyl dithiophosphate (DDTP) as a complexing agent and Triton X-114 as surfactant. As raw milk is a very complex matrix and has high fat content, it was necessary to perform the acid digestion of the sample before extraction cloud point. An optimization of the pre-concentration step was conducted employing central composite design varying volumes of the reagents used in the procedure. The accuracy and precision of the method were studied by analyzing samples doped in three different lead concentrations: 20, 50 and 100 $\mu\text{g/L}$. The method presented values between 80.8 and 112 % for recovery, and between 7 and 10 % for the standard deviation, being within acceptable ranges established by Regulation 657/2002 of the European Community. The average values for the detection limits obtained for the samples was 2,0; 4,5 and 5,8 $\mu\text{g/L}$ for concentrations of 20, 50 and 100 $\mu\text{g/L}$, respectively. The calculated pre-concentration factor was 4 to 5 times.

Keywords: Milk. Preconcentration. Cloud point extraction. X-ray fluorescence. TXRF.

Lista de figuras

Figura 1 – Estrutura representativa de um surfactante polar: (a) cadeia alquílica apolar e (b) grupo cabeça não iônica.....	5
Figura 2 - Esquema de um agregado micelar. Fonte: Bezerra & Ferreira, 2006.....	6
Figura 3 - Esquema da extração em pondo nuvem de um metal. Adaptado de Pytlakowska et al., 2013.....	7
Figura 4 – Configurações dos sistemas de fluorescência de raios X por (A) dispersão de comprimento de onda, (B) dispersão de energia e (C) reflexão total. Adaptado de Margui et al., 2014.....	9
Figura 5 - Esquema de preparo do disco de quartzo incluindo a hidrofobização e adição da amostra para análise. Adaptado de De La Calle et al., 2013b.....	10
Figura 6 - Espectro de raios X de uma solução multielementar com concentração de 1 ppm. Fonte: BRUKER, 2012.....	12
Figura 7 - Amostras de leite após a digestão ácida.....	21
Figura 8 - Disco de quartzo com fina película de amostra de leite digerido.....	22
Figura 9 - Comparação dos valores de recuperação quando utilizado Y e Ga como padrão interno com tempo de aquisição de 250 s.....	25
Figura 10 - Comparação dos valores de recuperação utilizando concentrações diferentes de Y como padrão interno e tempo de aquisição de 250 s.....	26
Figura 11 - Comparação dos tempos de leitura da amostra contendo Y 10 µg/L como padrão interno	27
Figura 12 – Espectro dos raios X obtido por TXRF proveniente da amostra de leite cru digerida	28
<i>Figura 13 - Teores de P, K, Ca, Cu, Zn, Rb, Sr e Br, e desvios padrão nos diferentes tipos de leite: LC (leite cru), LI (leite integral), LD (leite desnatado), LSD (leite semidesnatado), LECa (leite enriquecido com Ca) e LBL (leite com baixo teor de lactose).</i>	30

<i>Figura 14 - Gráficos dos escores e pesos obtidos por PCA para leites de teores diferentes de gordura. (A) PC1 x PC2. (B) PC1 x PC3. (C) PC2 x PC3.....</i>	34
Figura 15 - Estrutura do complexante O,O-dietilditiofosfato de amônio (DDTP).....	36
Figura 16 - Diagrama de fases para o Triton X-114 em solução aquosa. L, região com uma única fase; e 2L, região bifásica. Fonte: Laespada et al, 1993.....	37
Figura 17 - Gráfico de pareto dos efeitos padronizados. Variável: Sinal Pb	42
Figura 18 - Gráfico da superfície de resposta. Variável: Sinal Pb	42
Figura 19 - Espectros de raios X para amostra de leite após pré-concentração do Pb. (A) Ga como padrão interno. (B) Y como padrão interno.....	44

Lista de tabelas

Tabela 1 - Tipo de leite conforme teor de gordura	18
Tabela 2 - Programa de aquecimento empregado na digestão ácida assistida por radiação micro-ondas.....	22
Tabela 3 - Condições utilizadas para operação do S2 PICOFOX™	23
Tabela 4 - Concentrações dos padrões internos utilizadas em cada replicata	24
Tabela 5 – Valores certificados no MRC IAEA-153.....	24
Tabela 6 - Resultados obtidos na avaliação da veracidade e precisão do método empregando TXRF para análise de nutrientes minerais em leite	28
Tabela 7 - Autovalor, variância e variância acumulada de cada componente principal referentes aos elementos presentes nos leites	32
Tabela 8 - Níveis estudados no planejamento composto central com $\alpha=\sqrt{2}$	39
Tabela 9 - Matriz do planejamento experimental e resultados para sinal de Pb.....	41
Tabela 10 - Valores de recuperação de Pb em leite empregando o método proposto	45
Tabela 11 - Limites de detecção obtidos para o Pb na análise de leite cru pelo método proposto	46

Lista de abreviaturas

Br-PADAP	2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-dietilaminofenol
CMC	Concentração micelar crítica
DDTP	O,O-dietilditiofosfato de amônio
EDXRF	Fluorescência de raios X por dispersão de energia
EPN	Extração em ponto nuvem
F AAS	Espectrometria de absorção atômica com chama
ICP-MS	Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado
LBL	Leite com baixo teor de lactose
LC	Leite cru
LD	Leite desnatado
LECa	Leite semidesnatado enriquecido com Ca
LI	Leite integral
LSD	Leite semidesnatado
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MRC	Material de referência certificado
PAN	1-(2-piridilazo)-2-naftol
PCA	Análise de Componentes Principais
PI	Padrão interno
PNCRC	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
TAN	1-(2 thialolylazo)-2-naphthol
Triton X-114	Octilfenoxipolietoxietanol
TXRF	Fluorescência de raios X por reflexão total
UHT	Ultra alta temperatura
WDXRF	Fluorescência de raios X por dispersão de comprimento de onda
XRF	Fluorescência de raios X

Sumário

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	v
Lista de abreviaturas	vi
CAPÍTULO 1 - Introdução e objetivo	1
1.1 Introdução	2
1.1.1 O leite bovino	2
1.1.2 O chumbo	3
1.1.3 Extração em ponto nuvem	4
1.1.4 Fluorescência de raios X por reflexão total	8
1.2 Objetivo	15
CAPÍTULO 2 - Identificação dos tipos de leite	16
2.1 Introdução	17
2.2 Parte Experimental	19
2.2.1 Reagentes e Soluções	19
2.2.2 Amostras	20
2.2.3 Equipamentos e acessórios	20
2.2.4 Procedimento de digestão das amostras	21
2.2.5 Análise das amostras por TXRF	22
2.2.6 Otimização do padrão interno	23
2.2.7 Análise e comparação do teor de nutrientes em leites com diferentes características	24

2.3 Resultados e Discussão	25
2.3.1 Otimização do padrão interno	25
2.3.2 Comparação do teor de nutrientes de leites com diferentes características	27
CAPÍTULO 3 - Quantificação de chumbo no leite	35
3.1 Introdução	36
3.2 Parte Experimental	37
3.2.1 Reagentes e Soluções	37
3.2.2 Amostras	38
3.2.3 Equipamentos e acessórios	38
3.2.4 Otimização do método de extração em ponto nuvem	39
3.2.5 Estudo de veracidade e precisão	40
3.3 Resultados e Discussão	40
3.3.1 Otimização do método de extração em ponto nuvem	40
3.3.2 Avaliação das figuras de mérito	43
CAPÍTULO 4 - Considerações finais	48
CAPÍTULO 5 - Referências bibliográficas	51

CAPÍTULO 1

Introdução e Objetivo

1.1 Introdução

1.1.1 O leite bovino

O leite é um alimento completo por conter micronutrientes, aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas, carboidratos, lipídios, proteínas, elevada concentração de cálcio e substâncias bioativas em proporções adequadas para a nutrição humana (VIDAL, 2001). É amplamente consumido em todo o mundo, principalmente por crianças, uma vez que pode ser utilizado na forma *in natura* ou como matéria-prima para a produção de diversos outros produtos como queijos, iogurtes e manteiga.

O consumo de leite é importante e indicado para todas as idades (salvo em caso de restrição ou condições específicas), por ser também fonte de energia e a melhor fonte de cálcio. A ingestão adequada de cálcio vem sendo uma das principais estratégias alimentares para garantir um envelhecimento sadio e com menor risco a doenças degenerativas, comuns à terceira idade, como a osteoporose, por exemplo.

A produção de leite representa uma atividade de grande impacto socioeconômico em nosso país e tem crescido cada vez mais. No ano de 2012, o Brasil alcançou a marca de 32,3 milhões de toneladas produzidas e, mesmo não sendo autossuficiente, hoje é o 4º maior produtor de leite do mundo, sendo que o sistema produtivo baseia-se em leite a pasto (FAO, 2014; EMBRAPA, 2014). Com o aumento da produtividade de leite no Brasil, a produção excedente é utilizada para a elaboração de derivados lácteos que são encaminhados para o mercado externo (BRASIL, 2009).

Elementos potencialmente tóxicos, decorrentes da poluição ambiental, de fertilizantes fosfatados contaminados ou mesmo do emprego de rações e suplementos minerais de baixa qualidade na alimentação dos bovinos, podem ser acumulados, excretados no leite e, conseqüentemente, contaminar os seus consumidores (MARÇAL *et al.*, 1998; D'ILIO *et al.*, 2008). A fim de evitar esta situação, é necessário que o leite seja proveniente de animais sadios, colhido e armazenado em condições sanitárias satisfatórias e livre de contaminação ambiental.

Para o atendimento dos requisitos na qualidade e segurança da produção do leite, uma fiscalização eficiente se faz necessária. Esta fiscalização vem por meio do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC/Animal) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que

monitora níveis de metais tóxicos tais como Pb, dentre diversos outros resíduos e contaminantes orgânicos e inorgânicos presentes nesta matriz.

1.1.2 O chumbo

O elemento químico chumbo é um metal pesado, cinza-azulado, de baixo ponto de fusão que ocorre naturalmente na crosta terrestre. Normalmente, encontra-se combinado com dois ou mais elementos formando compostos químicos de Pb (ATSDR, 2007). É um metal tóxico e, em termos de potenciais efeitos adversos à saúde humana, este elemento está entre os que têm causado maior preocupação. Isto ocorre porque o Pb é facilmente transferido através da cadeia alimentar, não é utilizado em nenhuma função biológica essencial e tem habilidade de se acumular no corpo humano por longo período de tempo (LIU, 2003). Em alimentos, o chumbo está presente apenas por contaminação através do plantio/produção e/ou durante o processo de industrialização. A contaminação das plantas pode ocorrer pela absorção do Pb presente no solo, da água utilizada na irrigação ou pelo uso de fertilizantes contendo esse metal.

Já os animais podem ser contaminados através do consumo de água, plantas e ração contaminada. A presença de altas concentrações deste metal na água normalmente é devido às descargas de efluentes industriais, bem como o uso indevido de tintas e acessórios à base de chumbo. Vários casos de leite contaminado via intoxicação de bovinos por ingestão de ração contaminada ou exposição ambiental ao chumbo são relatados na literatura científica (OSKARSSON *et al.*, 1991; SANTOS, 2004; BARANOWSKA *et al.*, 2005; SWARUP *et al.*, 2005). Sharma *et al.* (1982) observaram que animais que ingeriram quantidades superiores a 500 mg de Pb por dia, produziram leite com níveis de Pb mais elevados, atingindo valores de cerca de 0,06 mg/L.

Por apresentar toxicidade acumulativa, o chumbo pode causar um envenenamento crônico denominado saturnismo, que consiste em dano ao sistema nervoso central resultando em sérios distúrbios que podem levar a convulsões e morte. A absorção do chumbo pelo trato gastrointestinal depende de fatores nutricionais como a ingestão de cálcio, ferro, fósforo e proteínas, uma vez que, possivelmente, envolva um mecanismo de competição, pois sabe-se que um baixo teor de Ca ou Fe na dieta aumenta a absorção do Pb (WHO/ICPS, 1995; ATSDR, 2007).

Após a absorção, o contaminante alcança a corrente sanguínea, sendo distribuído para os tecidos moles, principalmente rins e fígado. Uma parte é excretada juntamente com a bile, uma segunda parte é armazenada nesses órgãos e o restante retorna ao sistema circulatório na forma de fosfato de chumbo. Esta última parte, posteriormente será redistribuída pelo organismo, sofrendo deposição nos ossos, dentes e cabelos a longo prazo (MOREIRA & MOREIRA, 2004). Como resultado da absorção do Pb, tem-se a desmineralização e fragilidade óssea. Além disso, uma exposição aguda a este contaminante pode causar distúrbios gastrointestinais (anorexia, náuseas, vômitos, dor abdominal), lesão hepática e renal, e hipertensão.

Crianças são particularmente mais vulneráveis aos efeitos neurotóxicos do chumbo, e até níveis relativamente baixos de exposição ao metal podem causar danos neurológicos graves, e em alguns casos, irreversíveis. Apesar de acumular pouco no cérebro, o chumbo causa danos no sistema nervoso central levando à encefalopatia e neuropatia. Além disso, esse metal também tem sido associado a agressão e transtorno de déficit de atenção. Bebês e crianças pequenas (especialmente aqueles com menos de 5 anos de idade) são mais susceptíveis aos efeitos adversos uma vez que podem absorver de 4 a 5 vezes mais chumbo que adultos (WHO, 2010).

Como a ingestão de leite pelas crianças é grande, sendo uma das principais fontes de alimentação nos primeiros anos de vida, o controle de qualidade destes alimentos, que engloba a determinação de Pb, é fundamental para garantir a saúde da população. O limite máximo de chumbo permitido em leite cru é de 20 µg/L. Este valor, adotado pelo Brasil, é estabelecido pelo regulamento (CE) nº 1881/2006 e pelo CODEX STAN 193-1995, 2010. A determinação de Pb nessa faixa de concentração requer métodos analíticos com boa sensibilidade. Quando a técnica analítica disponível para análise não apresenta sensibilidade adequada, são empregados procedimentos de pré-concentração.

1.1.3 Extração em ponto nuvem

A determinação de elementos-traço em amostras biológicas é bastante complicada devido à complexidade da matriz e às baixas concentrações desses elementos em tais amostras. Mesmo com os avanços no desenvolvimento de novas técnicas analíticas, mais sensíveis e seletivas, muitas vezes são necessárias etapas de separação e pré-concentração dos analitos (BEZERRA & FERREIRA, 2006). Nesse sentido, o método de extração em ponto nuvem (EPN) é um procedimento de destaque por apresentar baixo custo, simplicidade,

rapidez, alto fator de concentração do analito, além da redução dos volumes de reagentes, minimizando o manuseio de substâncias tóxicas (PYTLAKOWSKA *et al.*, 2013).

O fenômeno Ponto Nuvem ocorre quando tensoativos (não iônicos ou anfóteros) em quantidades acima da concentração micelar crítica (CMC) são aquecidos à uma determinada temperatura, separam-se em duas fases isotrópicas (a solução começa subitamente a ficar turva, devido ao decréscimo de solubilidade do tensoativo em água) (NASCENTES *et al.*, 2002).

A utilização desse fenômeno para pré-concentração, que foi descrita pela primeira vez por Watanabe e Tanaka em 1978, se baseia na formação de micelas e a subsequente separação. Uma solução aquosa contendo os analitos e surfactantes não-iônicos acima da CMC é aquecida a uma temperatura superior à de ponto nuvem, tornando-se turva. A solução então, se separa em duas fases em que a de grande volume, contendo solução aquosa (matriz), deve ser descartada, e a de pequeno volume, rica em surfactante e contendo o analito de interesse, é analisada (BADER *et al.*, 2014; MANZOORI & KARIM-NEZHAD, 2002).

A palavra surfactante, derivada do termo em inglês “surface-active agent”, também chamado de tensoativo e se refere à classe de compostos conhecidos como anfipáticos. Estes compostos são substâncias orgânicas de cadeia longa alquílica contendo de 8 a 18 átomos de carbono e uma extremidade hidrofílica polar ou iônica (Figura 1). Dessa forma, os surfactantes possuem propriedades tais como a capacidade de formar bolhas e espumas na superfície de um líquido e a redução na tensão superficial ou interfacial do meio no qual é dissolvido (FARIA *et al.*, 2005; BEZERRA & FERREIRA, 2006; ROCHA, 2013). Esses surfactantes são classificados de acordo com a natureza do grupo cabeça. Os catiônicos suportam cargas positivas, os aniônicos suportam cargas negativas, os anfóteros possuem ambos os grupos aniônicos e catiônicos, podendo apresentar carga positiva ou negativa dependendo do pH do meio e, por fim, os não iônicos não apresentam cargas.

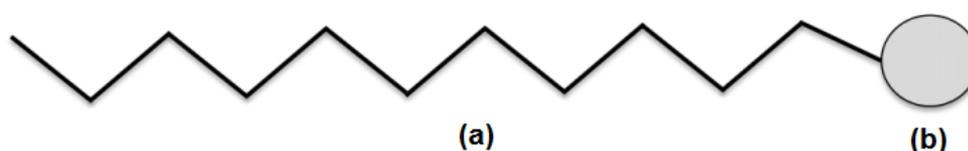


Figura 1 – Estrutura representativa de um surfactante polar: (a) cadeia alquílica apolar e (b) grupo cabeça não iônica

Moléculas anfipáticas, como os surfactantes, apresentam propriedade de auto-associação em solventes aquosos ou apolares. Este processo resulta na formação de

estruturas organizadas tais como as micelas normais, micelas reversas, microemulsões e as vesículas. O arranjo final é determinado, principalmente, pela estrutura química do surfactante e pela natureza do meio (SANZ-MEDEL *et al.*, 1999). As micelas normais ou aquosas, são agregados formados em solução aquosa por meio da associação das moléculas individuais de surfactante. Enquanto os grupos cabeça do surfactante estão voltados para a solução aquosa formando uma superfície hidrofílica, as caudas alquílicas estão voltadas para o centro da micela, formando um núcleo central apolar.

A concentração mínima de um surfactante para a formação de micelas (CMC) depende da sua estrutura molecular e das condições experimentais (temperatura, força iônica, etc). Abaixo da CMC, o surfactante se encontra predominantemente na forma de monômeros livres. No entanto, em concentrações acima da CMC, a formação das micelas é favorecida, e por não serem estruturas estáticas, permanecem em equilíbrio com os seus próprios monômeros em solução, como apresentado na Figura 2 (QUINA & HINZE, 1999). As micelas têm como vantagem, serem facilmente reprodutíveis e termodinamicamente estáveis. Entretanto, podem ser destruídas com a adição de água no sistema, uma vez que a concentração do surfactante se torna menor que a concentração micelar crítica (BEZERRA & FERREIRA, 2006)

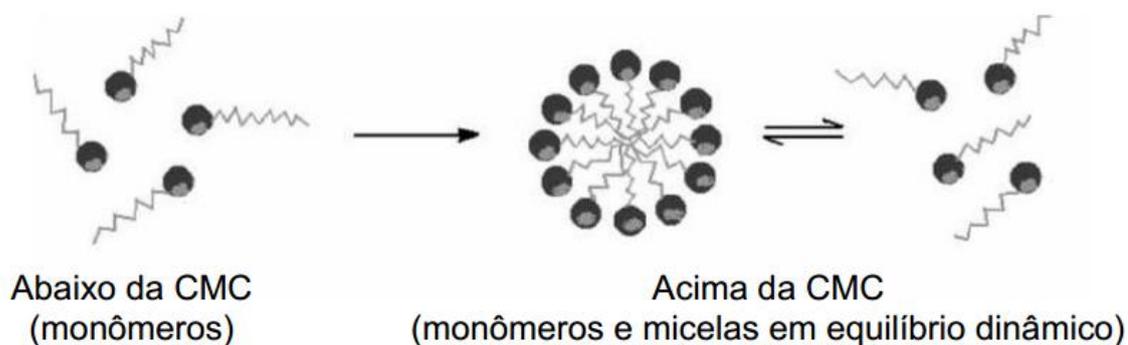


Figura 2 - Esquema de um agregado micelar. Fonte: Bezerra & Ferreira, 2006.

A capacidade de solubilização de compostos com diferentes características é uma importante propriedade das micelas. Para a extração de íons metálicos, por não possuírem afinidade com as micelas, na maioria das vezes torna-se necessário o uso de reagentes complexantes, tais como 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN), O,O-dietilditiofosfato de amônio (DDTP) e 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-dietilaminofenol (Br-PADAP), para a formação de um quelato hidrofóbico. Em tais casos, a eficiência da EPN depende da hidrofobicidade do ligante e do complexo, da cinética de formação do complexo e sua transferência entre as fases (PYTLAKOWSKA *et al.*, 2013).

O procedimento da extração em ponto nuvem de metais é bem simples como apresentado no esquema da Figura 3. Inicia-se com a adição de um agente complexante na solução já tamponada para a formação do quelato hidrofóbico. Posteriormente, poucos mililitros de uma solução concentrada de surfactante são adicionados à mistura. A solução então, é homogeneizada e aquecida em um banho termostatizado até que atinja uma temperatura acima do ponto nuvem a fim de ocorrer a separação das fases. Para a aceleração desse processo, a amostra é levada à centrífuga. Ao fim desta etapa, o tubo da centrífuga contendo as duas fases é levado a um banho de gelo para que a fase micelar (rica em surfactante e de menor volume) se torne mais viscosa com a diminuição da temperatura, e seja mais fácil o descarte da fase aquosa. Por fim, adiciona-se à fase micelar, um pequeno volume de um diluente adequado à técnica de análise a ser utilizada, a fim de diminuir a viscosidade e homogeneizar a amostra antes do processo de medida (BEZERRA & FERREIRA, 2004; 2006).

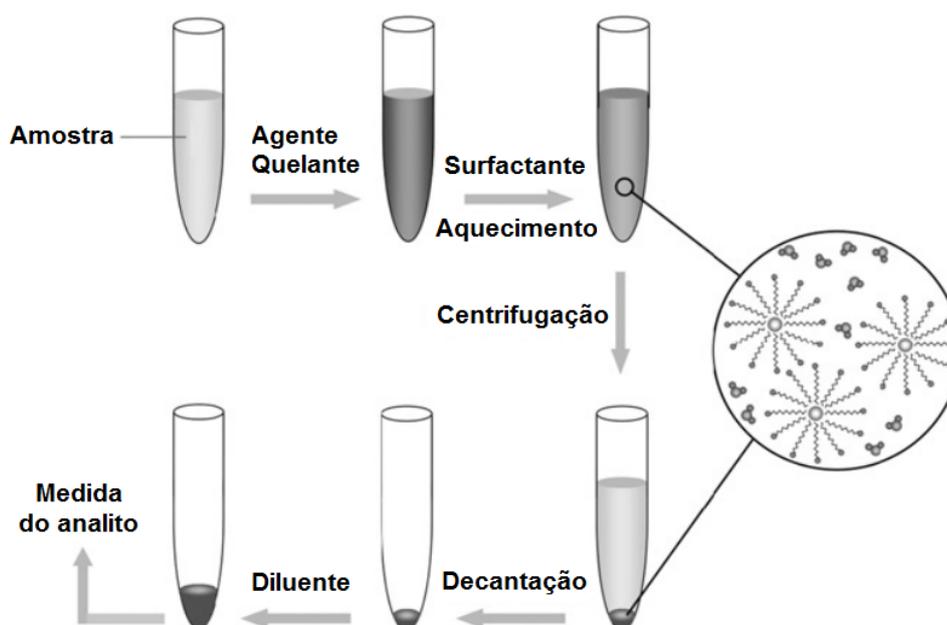


Figura 3 - Esquema da extração em ponto nuvem de um metal. Adaptado de Pytlakowska et al., 2013

Há na literatura diversos trabalhos empregando extração em ponto nuvem como método de pré-concentração do chumbo. A maior parte destes estudos são para a determinação deste elemento em água. Chen *et al.* (2001) propuseram um procedimento de determinação de Cd, Cu, Pb e Zn por F AAS em amostras de água após a EPN. Para isso, utilizaram o 1-(2 thialolylazo)-2-naphthol (TAN) como agente complexante e Triton X-114 como surfactante. Foi utilizada também uma solução de metanol em HNO₃ como diluente para

diminuir a viscosidade da fase rica, de modo que obtiveram fatores de enriquecimento de 57,7; 64,3; 55,6 e 63,7 para Cd, Cu, Pb e Zn, respectivamente.

Já no trabalho de Silva *et al.* (2000) foi proposto um método de pré-concentração por EPN de Ag, As, Au, Cd, Cu, Pb e Se utilizando DDTP como agente complexante e Triton X-114 como surfactante, e posterior análise por ICP-MS obtendo assim, um fator de enriquecimento de 25 para o Pb. Depois *et al.* (2012), realizaram a extração do Pb, utilizando os mesmos reagentes, em amostras de tecido de ostra e folhas de tabaco obtendo um fator de enriquecimento de 14.

Muitos outros métodos para a extração em ponto nuvem do Pb utilizando DDTP e Triton X-114 foram desenvolvidos para matrizes orgânicas como sangue (BORGES *et al.*, 2003), urina, músculo, cabelo e rim (MARANHÃO *et al.*, 2005; 2007). Já para o leite, apenas estudos visando a pré-concentração de analitos orgânicos foram encontrados.

Diversos trabalhos que utilizam a EPN como procedimento de pré-concentração de metais são publicados todo ano. No entanto, não foi localizado algum que combinasse esse procedimento de pré-concentração com a espectrometria de fluorescência de raios X por reflexão total para a determinação de Pb.

1.1.4 Fluorescência de raios X por reflexão total

A análise por fluorescência de raios X (XRF – *X-ray fluorescence*) baseia-se na medição das intensidades dos raios X característicos emitidos pelos elementos que constituem uma amostra sólida ou líquida, quando irradiada com elétrons, prótons, raios X ou gama com energias apropriadas. Quando os elétrons da camada mais interna do átomo (ex.: K e L) interagem com fótons com energia na região dos raios X, ocorre a foto ejeção desses elétrons, criando-se uma vacância. Para promover a estabilidade, imediatamente as vagas eletrônicas são preenchidas pelos elétrons das camadas mais próximas. Como resultado, há um excesso de energia no processo, que é manifestado na forma de emissão de raios X de comprimentos de onda característicos de cada átomo presente na amostra.

Até 1966, as análises por XRF eram realizadas utilizando apenas a técnica de fluorescência de raios X por dispersão de comprimento de onda (WDXRF – *Wavelength Dispersive X-Ray Fluorescence*), na qual é necessário um equipamento que permita um movimento sincronizado entre o cristal difrator e o detector, a fim de selecionar os raios X

característicos de acordo com seu comprimento de onda, obedecendo à lei de Bragg da difração (MARGUI *et al.*, 2014).

Com o desenvolvimento dos detectores semicondutores de Si(Li), Ge(Li) e Ge hiperpuro, capazes de distinguir raios X de energias próximas sem o auxílio de um cristal difrator, foi possível o aparecimento da nova técnica de análise: a fluorescência de raios X por dispersão de energia (EDXRF – *Energy Dispersive X-Ray Fluorescence*) (Nascimento Filho, 1999). Também conhecida como fluorescência de raios X não dispersiva, essa técnica se mostra mais prática e com custo reduzido, sendo utilizada principalmente em matrizes sólidas, permitindo a análise simultânea ou sequencial sem a necessidade de um pré-tratamento químico da amostra. Como desvantagens, apresenta menor sensibilidade e maior interferência espectral.

Como uma variante da EDXRF, a técnica de fluorescência de raios X por reflexão total (TXRF – *Total Reflection X-Ray Fluorescence*) foi proposta como método analítico por Yoneda & Horiuchi em 1971 e desenvolvida por Aiginger & Wobrauschek a partir de 1975. Knoth & Schwenke (1978) construíram o primeiro instrumento compacto que foi utilizado para análises na década de 80, quando começaram a surgir os primeiros trabalhos.

A TXRF surgiu para solucionar principalmente a baixa sensibilidade da EDXRF. Enquanto o ângulo de incidência e o de reflexão são de aproximadamente $45^\circ/45^\circ$ na EDXRF, na TXRF são de $0,1^\circ/90^\circ$ conforme mostrado na Figura 4 (KLOCKENKÄMPER *et al.*, 2001). Essa diferença na geometria faz com que ocorra a reflexão total dos raios X. Como o feixe de radiação atinge a amostra com um ângulo muito pequeno, a interação com o substrato é minimizada. A radiação emitida é detectada perpendicularmente e bem próxima à amostra (3 a 5 mm), aumentando a eficiência da detecção dos raios X, uma vez que a razão pico/background é maximizada (Nascimento Filho, 1999).

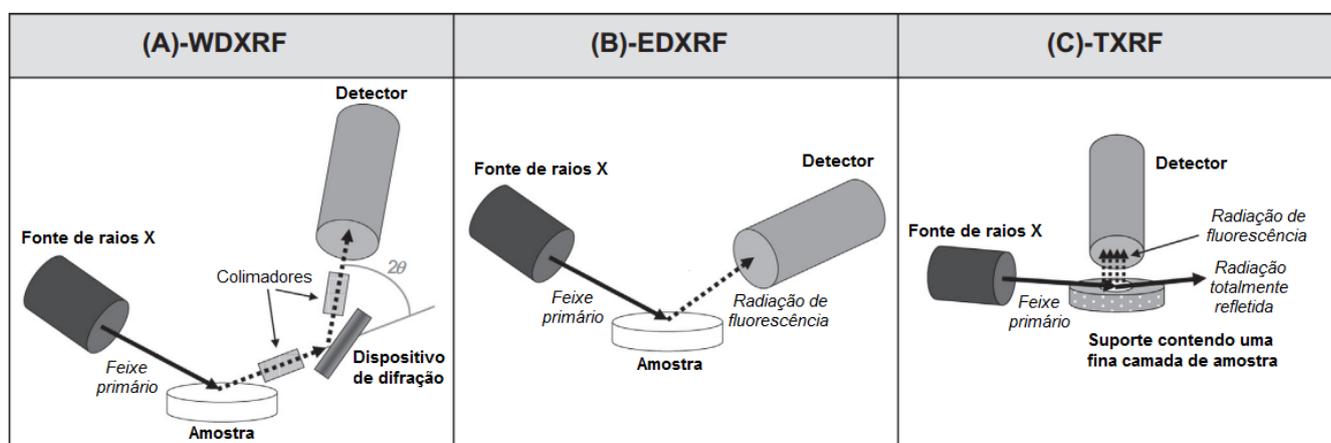


Figura 4 – Configurações dos sistemas de fluorescência de raios X por (A) dispersão de comprimento de onda, (B) dispersão de energia e (C) reflexão total. Adaptado de Margui *et al.*, 2014

Para realizar a análise por TXRF, são necessários porta amostras que geralmente são discos de 30 mm de diâmetro e 3 mm de espessura. Também conhecidos como refletores, suportes e *wafers*, esses discos devem ser selecionados de acordo com o objetivo pois podem ser feitos de quartzo, carbono vítreo, safira ou acrílico (DE LA CALLE *et al.*, 2013b).

O preparo das amostras para análise é simples, como mostrado na Figura 5. No caso de se utilizar o disco de quartzo, é necessária uma etapa de hidrofobização por adição de 1 a 25 μL de solução de silicone em isopropanol e a posterior secagem a 80 °C durante 30 min a fim de reter a amostra no disco (BRUKER, 2012). Para análise, volumes de 5 a 50 μL da amostra líquida ou sólida em suspensão deve ser depositada no centro do disco de modo que, ao secar, se forme um filme fino como apresentado na Figura 5b.

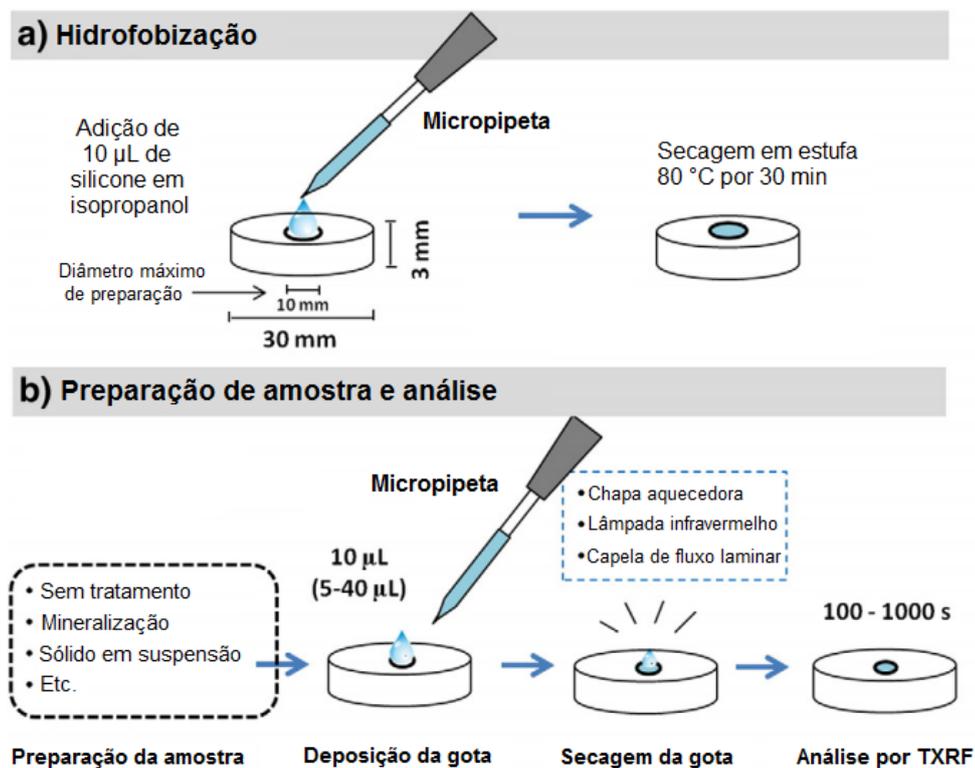


Figura 5 - Esquema de preparo do disco de quartzo incluindo a hidrofobização e adição da amostra para análise. Adaptado de De La Calle *et al.*, 2013b.

Devido à alta energia dos raios X e a esta fina camada de amostra, não ocorre efeito de absorção, conseqüentemente a correção para o efeito matriz não se faz necessária (Silva *et al.*, 2004). Para análises quantitativas, basta uma simples calibração pela adição de padrão interno às amostras, permitindo assim, a correção de fatores como flutuações no gerador de raios X, erros operacionais (ex.: pipetagem) e demais instabilidades do sistema. Para isso, o elemento escolhido como padrão interno, não deve estar presente na amostra, ou ocorrer em

baixíssimas concentrações, e não deve interferir no(s) elemento(s) a ser(em) quantificado(s). Sendo assim, padrões internos mais comumente utilizados são Ga, Y e Ge (Nascimento Filho, 1999).

Desse modo, a equação básica para análise quantitativa é a que relaciona a intensidade dos raios X característicos, com a sensibilidade elementar, como apresentado a seguir:

$$I_i = C_i \cdot S_i \quad (1)$$

Onde:

I_i = intensidade (cps) da linha característica $K\alpha$ ou $L\alpha$ emitida;

C_i = concentração (ppm) do analito i na solução pipetada no disco;

S_i = sensibilidade elementar do sistema (cps/ppm) para o analito i .

Para se obter a intensidade do padrão interno, a equação 1 é descrita desta maneira:

$$I_p = C_p \cdot S_p \quad (2)$$

Para calcular a concentração de um analito, é necessário conhecer o valor da sensibilidade relativa S'_i deste elemento. Este é um valor adimensional que indica uma relação entre a intensidade do pico do analito e quantidade na amostra. Em geral, as sensibilidades relativas podem ser determinadas pelo cálculo de parâmetros fundamentais como probabilidades de excitação, eficiência do detector etc. No entanto, uma maneira mais fácil de se obter o valor de S'_i é analisar uma solução multielementar de concentrações conhecidas, e calcular o fator de sensibilidade que baseia-se no pico de cada elemento.

A Figura 6 apresenta um espectro de TXRF para uma solução multielementar com concentração de 1 ppm. Pode-se observar que quanto maior o nível de energia, maior é a sensibilidade resultando assim, numa maior altura do pico.

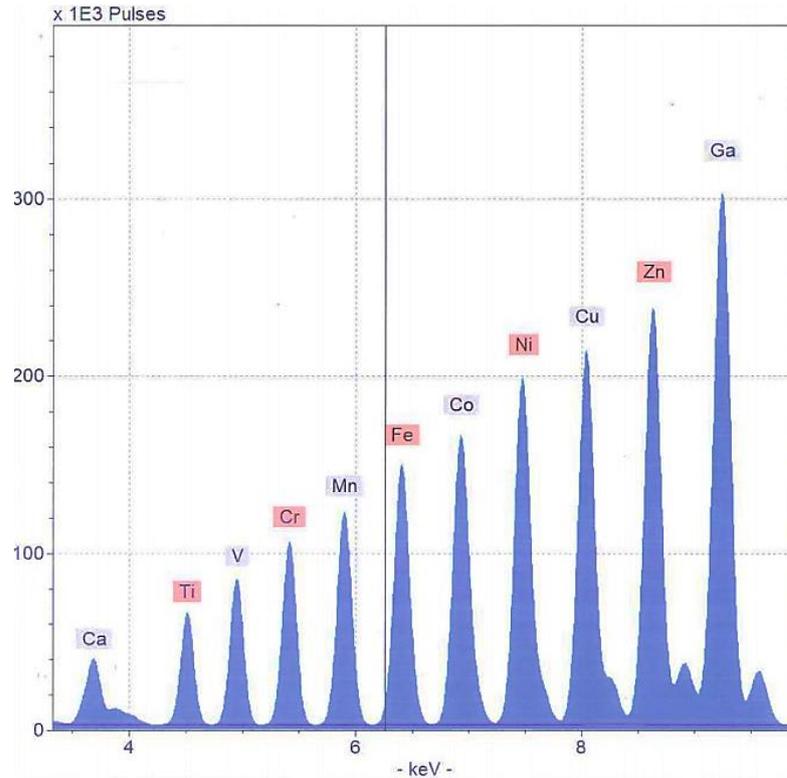


Figura 6 - Espectro de raios X de uma solução multielementar com concentração de 1 ppm. Fonte: BRUKER, 2012.

Então, o valor da sensibilidade relativa S'_i pode ser determinado efetuando a divisão entre as equações 1 e 2 que, em outras palavras, significa a razão entre a sensibilidade do analito S_i e a sensibilidade do padrão interno S_p .

$$S'_i = \frac{I_i \cdot C_p}{I_p \cdot C_i} \quad (3)$$

Sendo assim, para o cálculo da concentração do analito, basta rearranjar a equação 3:

$$C_i = \frac{I_i \cdot C_p}{I_p \cdot S'_i} \quad (4)$$

Como os elementos são identificados e quantificados por meio de seus picos de fluorescência, a definição dos limites de detecção baseia-se numa inspeção estatística da área do pico e o fundo espectral subjacente. Este fundo, também chamado background, se

apresenta como uma linha aproximadamente contínua sob os picos e consiste no resultado das interações das radiações espalhadas pela amostra com o detector, e também das próprias radiações características emitidas pelos elementos. Deste modo, presume-se que um elemento i é considerado para ser detectado se a área do pico é três vezes maior que a contagem do background. Este procedimento é também conhecido como o critério 3-sigma e está demonstrado na equação 5 (KUMP, 1997):

$$LD_i = \frac{3 \cdot \sqrt{I_{BG}}}{S_i} \quad (5)$$

Onde:

LD_i = limite de detecção (ppm) do analito i ;

I_{BG} = intensidade (cps) do background abaixo do pico do analito i ;

S_i = sensibilidade elemental do sistema (cps/ppm) para o analito i .

Substituindo a equação 1 na 5, obtem-se:

$$LD_i = \frac{3 \cdot C_i \cdot \sqrt{I_{BG}}}{I_i} \quad (6)$$

Esta última equação indica que o limite de detecção é inversamente proporcional à intensidade do pico que, por sua vez, é apresentada em contagens por segundo. Dessa forma, pode-se afirmar que o limite de detecção é uma função do tempo sendo representada pela equação 7.

$$LD \approx \frac{1}{\sqrt{t}} \quad (7)$$

Portanto é interessante a avaliação do tempo de medida das amostras a fim se se obter um menor limite de detecção. Ao mesmo tempo vale ressaltar que é desnecessário usar um tempo de 1000 segundos de leitura de uma amostra em que os elementos estudados estão em concentrações percentuais (BRUKER, 2012)

Vantagens relevantes da TXRF incluem a capacidade de análise multielementar simultânea, análise de pequenas quantidades de amostras (μL ou mg), baixos limites de

detecção (na ordem de ppb), tempo relativamente curto de análise (100 – 1000s) e o baixo custo de operação por não exigir sistema de refrigeração e consumo de gás para funcionar (KLOCKENKAMPER & VON BOHLEN, 1996; MARGUI *et al.*, 2004).

Em contrapartida, a TXRF apresenta desvantagens relacionadas à baixa resolução espectral e picos sobrepostos, podendo superestimar ou subestimar elementos de baixas concentrações (DE LA CALLE *et al.*, 2013b). Como exemplo dessa sobreposição, tem-se as linhas $K\alpha$ do As (10,53 keV) e $L\alpha$ do Pb (10,55 keV), que dificulta a quantificação de um desses elementos quando o outro também se encontra presente na amostra. Elementos mais leves que o Al não podem ser medidos porque sua radiação de raios X é tão baixa que é absorvida pelo ar antes de atingir o detector. Por fim, os elementos utilizados no tubo de raios X e no porta amostra também não podem ser quantificados. Por exemplo, Mo e Si não podem ser determinados em um equipamento com tubo de Mo, quando o porta amostras utilizado é de quartzo (interferência para a determinação de Si) (JUVONEN *et al.*, 2009).

Dhara & Misra (2011) utilizaram o método TXRF para determinação de Pb em água de chuva. As amostras foram analisadas sem a necessidade de pré-tratamento. O Ga foi utilizado como padrão interno e depositado juntamente com as amostras no disco de quartzo. O tempo de análise foi de 1000s e a concentração encontrada foi de 2,7 $\mu\text{g/L}$ de Pb. De forma similar, Guimarães *et al.* (2011) determinaram Pb em urina de rato por TXRF, de modo que apenas 2 μL de amostra com Ga como padrão interno foram depositados no porta amostras. O tempo de leitura foi de 250s e o limite de detecção alcançado foi de 100 $\mu\text{g/L}$.

Já no trabalho de Souza *et al.* (2014), a determinação de metais pesados em lamas e esgotos por TXRF foi precedida da digestão ácida das amostras utilizando HNO_3 e H_2O_2 como reagentes. Os LD encontrados foram de 2,81 e 1,99 $\mu\text{g/L}$ de Pb para o esgoto e o lodo, respectivamente. O método de digestão de amostras utilizando HNO_3 também foi utilizado por Silva *et al.* (2013) para a determinação de Pb, Cd e Ni em sangue por TXRF. Novamente o Ga foi escolhido como padrão interno e o limite de detecção para o chumbo foi de 1,0 $\mu\text{g/L}$.

Outro tipo de preparo de amostra muito utilizado é a extração. Esse procedimento de pré-concentração muitas vezes se torna necessário devido à complexidade da matriz e baixo teor do analito. Nesse sentido, De La Calle *et al.* (2013a) utilizaram um procedimento de extração em que uma mistura diluída de HNO_3 , HCl e HF é adicionada à amostra de plantas que em seguida é sonicada. Após a análise por TXRF o limite de detecção obtido para o chumbo foi de 2,9 mg/kg.

Não foi encontrado um trabalho em que o chumbo é determinado por TXRF em amostras de leite bovino. Entretanto, Da Costa *et al.* (2002) realizaram experimentos com

amostras de colostro em que Fe, Cu e Zn foram quantificados utilizando a técnica de fluorescência de raios X por reflexão total. As amostras foram tratadas com HNO₃ e H₂O₂ a 60°C durante 5 dias. Para padrão interno, o Ga foi escolhido e os limites de detecção foram abaixo de 10 µg/L.

1.2 Objetivo

Este trabalho teve como objetivo realizar uma avaliação da composição mineral de leites comerciais a fim de verificar a existência de uma correlação entre as concentrações dos elementos P, S, K, Ca, Cu, Zn e Br, presentes nessas amostras, com o teor de gordura e tratamentos realizados para leites especiais (baixa lactose e enriquecidos com Ca).

Além disso, foi desenvolvido um método para determinação de chumbo em leite cru utilizando espectrometria de fluorescência de raios X por reflexão total (TXRF) em conjunto com o procedimento de pré-concentração conhecida como extração em ponto nuvem, a fim de atender às legislações vigentes que estabelecem 20 µg/L como o limite máximo permitido de Pb nessa matriz.

CAPÍTULO 2

Identificação dos tipos de leite

2.1 Introdução

O leite possui em média 87 % de água, 9 % de sólidos não gordurosos (3,3 % de proteína, 4,6 % de lactose e 0,7 % de cinzas) e 4,0 % de gordura. Além disso, fornece grande variedade de nutrientes não energéticos mas essenciais para o organismo humano, tais como cálcio, fósforo, potássio, vitaminas, dentre outros (WALSTRA *et al.*, 2006).

Muitos minerais de leite estão associados em conjunto sob a forma de sais, tais como fosfato de cálcio. No leite aproximadamente 67 % do cálcio, 35 % do magnésio, e 44 % do fosfato estão na forma de sais ligados dentro das micelas de caseína e o restante estão solúveis na fase do soro. O fato de cálcio e fosfato estarem na forma de sais ligados com a proteína não afeta a disponibilidade nutricional de cálcio ou fosfato (MCSWEENEY & FOX, 2009). O leite contém pequenas quantidades de cobre, ferro, manganês, potássio e sódio, mas não é considerado uma das principais fontes desses minerais na dieta.

Para a comercialização do leite, é necessário tomar medidas para evitar, ou pelo menos adiar a sua deterioração, que pode ser causada por microrganismos ou envolver alterações enzimáticas, químicas e físicas. Neste sentido, as técnicas mais utilizadas para a esterilização do leite são a pasteurização e a ultrapasteurização também conhecida como UHT (Ultra High Temperature).

Na pasteurização eleva-se o leite à temperatura em torno de 75 °C, por 15 segundos e depois rebaixa-se imediatamente sua temperatura a 4 °C, conservando-o dessa forma até o consumo (BRASIL, 2011). Por sua vez, na ultrapasteurização eleva-se o leite à temperatura entre 130 e 150 °C, de 2 a 4 segundos e em seguida rebaixa-se a uma temperatura inferior a 32 °C (BRASIL, 1996). Este último é o sistema utilizado nos leites longa vida, que permite a conservação do produto por até 6 meses em embalagem e temperatura adequadas.

O tratamento térmico suave utilizado na pasteurização do leite não afeta significativamente o teor das vitaminas. No entanto, o tratamento térmico mais utilizado para pasteurização e conservação prolongada (UHT) combinado com o aumento da validade destes produtos provocam perdas de algumas vitaminas solúveis em água. Tiamina é reduzida de 0,45 para 0,42 mg/L, vitamina B 12 é reduzida de 3,0 para 2,7 µg/L, e vitamina C é reduzida de 2,0 para 1,8 mg/L (Potter *et al.*, 1984). Com relação aos minerais, a literatura descreve que o fosfato de cálcio irá migrar para dentro e para fora das micelas de caseína com mudanças na temperatura. Este processo é reversível a temperaturas moderadas e isso não afeta as propriedades nutricionais de minerais do leite. Em temperaturas muito elevadas,

o fosfato de cálcio pode precipitar no soro do leite, o que provoca mudanças irreversíveis na estrutura da caseína (MCSWEENEY & FOX, 2009).

Existem no mercado vários tipos de leite longa vida. As diferenças entre eles são em relação ao teor de gordura e/ou ingredientes adicionados. Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite UHT (UAT) (BRASIL, 1997), o leite recebe diferentes denominações conforme seu teor de gordura (Tabela 1). O teor de gordura do leite, depende de vários fatores referentes ao animal (genética, estágio de lactação, fermentações ruminais, infecções do úbere) ao tipo de alimentação (grão, carboidratos e proteínas da dieta, os efeitos sazonais e regionais) (Jensen, 2002). O teor de gordura do leite comercializado é, no entanto, padronizado para um valores de acordo com o estabelecido na Tabela 1. Normalmente, a padronização é realizada da seguinte forma: primeiramente o leite cru é centrifugado e o creme é retirado. Posteriormente, o teor de gordura é ajustado pela adição de creme nas proporções estabelecidas para cada tipo de leite.

Tabela 1 - Tipo de leite conforme teor de gordura

Tipo de leite	Teor de gordura
Integral	Mínimo 3 %
Semidesnatado	Entre 2,9 e 0,6 %
Desnatado	Máximo 0,5 %

Além disso, a indústria de laticínios tem desenvolvido bebidas de leite fluido especiais para atender as diversas necessidades nutricionais dos consumidores. Atualmente, estão disponíveis leites com lactose reduzida e leite livre de lactose para pessoas com intolerância. Esses leites com baixa lactose e isentos de lactose são processados, antes da embalagem, com a enzima lactase para quebrar a lactose em seus açúcares componentes, glicose e galactose (MCSWEENEY & FOX, 2009). Bebidas lácteas especiais também estão disponíveis e são adequadas a segmentos específicos da população. Há bebidas de leite que são enriquecidas com proteínas e cálcio projetado para adultos. Há leites contendo menor teor de carboidratos e fortificados com vitaminas para as pessoas com sobrepeso. Bebidas lácteas destinadas a crianças tem menor teor de gordura e são fortificados com cálcio ou ferro.

Apesar da grande diversidade de produtos, não existem muitos trabalhos na literatura que avaliem o efeito dos diferentes tratamentos na composição mineral do leite. As empresas de laticínio informam apenas o teor de Ca, sendo que alguns fornecem o mesmo valor de Ca (independente do tipo de leite, com exceção dos enriquecidos com cálcio) e em outras marcas a concentração de Ca é diferente para leites integrais, semidesnatados e desnatados.

Dessa forma, nesta parte do trabalho objetivou-se avaliar a composição mineral de diferentes tipos de leite empregando a técnica TXRF. Com os resultados obtidos, tentou-se verificar possíveis diferenças em função do teor de gordura e também dos tratamentos realizados para leites especiais (baixa lactose e enriquecidos com Ca). Para isso, lançou-se mão da Análise de Componentes Principais (PCA).

A Análise de Componentes Principais é uma técnica da estatística multivariada que consiste em transformar um conjunto de variáveis originais em outro conjunto de variáveis de mesma dimensão denominadas de componentes principais. Os componentes principais apresentam propriedades importantes: cada componente principal é uma combinação linear de todas as variáveis originais, são independentes entre si e estimados com o propósito de reter, em ordem de estimação, o máximo de informação, em termos da variação total contida nos dados. A PCA é associada à ideia de redução de massa de dados, com menor perda possível da informação. Procura-se redistribuir a variação observada nos eixos originais de forma a se obter um conjunto de eixos ortogonais não correlacionados. Esta técnica pode ser utilizada para geração de índices e agrupamento de indivíduos. A análise agrupa os indivíduos de acordo com sua variação, isto é, os indivíduos são agrupados segundo suas variâncias, ou seja, segundo seu comportamento dentro da população, representado pela variação do conjunto de características que define o indivíduo, ou seja, a técnica agrupa os indivíduos de uma população segundo a variação de suas características (VARELLA, 2008).

2.2 Parte Experimental

2.2.1 Reagentes e Soluções

- Ácido nítrico concentrado, HNO_3 65% m/v, Alphatec, $d = 1,4$ g/mL.
- Peróxido de hidrogênio, H_2O_2 30% m/v, Merck, $d = 1,11$ g/mL.
- Acetona pura, $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ PA, Cromato Produtos Químicos.
- Solução de silicone em isopropanol.
- Soluções estoque de Ga e Y de 1000 mg/L, Fluka.

Todas as soluções foram preparadas utilizando-se água deionizada com resistividade de 18,2 M Ω cm, purificada em sistema Milli-Q[®] da Millipore e foram acondicionadas em frascos de polipropileno.

2.2.2 Amostras

Para este estudo, um total de 15 amostras de leites comerciais UHT disponíveis no varejo da cidade de Belo Horizonte foram selecionadas, compreendendo diferentes teores de gordura (integral, semidesnatado e desnatado) e leites especiais com baixa lactose e enriquecidos com cálcio. Além disso, utilizou-se também leite cru coletado no Centro de Produção Sustentável Fazenda Modelo Pedro Leopoldo da Escola de Veterinária da UFMG que está localizada no município de Pedro Leopoldo. As amostras de leite foram armazenadas em frascos de 50 mL e armazenados em freezer.

O Material de referência de leite em pó IAEA-153 da International Atomic Energy Agency (IAEA) foi utilizado para a escolha do padrão interno mais adequado para as análises. O IAEA-153 e o leite em pó NIST 1549 (nonfat milk powder) da National Institute of Standards and Technology foram utilizados para avaliar a veracidade da análise por TXRF.

2.2.3 Equipamentos e acessórios

- Espectrômetro de fluorescência de raios X por reflexão total, marca Bruker, modelo S2 Picofox™;
- Purificador de ácidos, marca Milestone, modelo DuoPUR Subboiling Destillation System;
- Purificador de água, marca Millipore, modelo Milli-Q® Element;
- Forno de micro-ondas, marca Anton-Paar, modelo Multiwave 3000®;
- Balança Analítica, marca Shimadzu, modelo AUW220D;
- Estufa com circulação de ar, marca Tecnal;
- Micropipetas de volumes ajustáveis (1000-5000 µL, 200-1000 µL, 20-200 µL, 10-100 µL e 2- 20 µL);
- Tubos de centrífuga de polipropileno graduados com capacidade de 15,0 e 50,0 mL;
- Tubos Eppendorf de 1,5 mL
- Dessecador;
- Bomba de vácuo, marca Millipore;
- Discos de quartzo, marca Bruker.

2.2.4 Procedimento de digestão das amostras

Para a decomposição das amostras de leite em sistema fechado foi utilizado forno de micro-ondas (modelo Multiwave 3000® da Anton Paar) equipado com rotor específico para 8 amostras e frascos de quartzo. O procedimento utilizado foi previamente estabelecido através da avaliação visual dos digeridos. O objetivo desta avaliação inicial foi obter a menor diluição possível das amostras (para se tentar determinar micronutrientes) com a menor concentração ácida. Desta forma foram avaliadas concentrações de HNO_3 variando de a 10 a 50 % v/v, o volume de leite variando de 1,0 a 3,0 mL e o volume de H_2O_2 variando de 0,5 a 1,5 mL de modo que ao final, o frasco contivesse um volume total de no mínimo 6 mL de líquido. Na Figura 7 pode-se observar o aspecto dos digeridos obtidos nas condições ótimas.



Figura 7 - Amostras de leite após a digestão ácida

Após essa avaliação, o procedimento consistiu em pipetar 2,5 mL de leite, previamente descongelado e homogeneizado, no frasco de quartzo. Em seguida, foram adicionados 2,5 mL de HNO_3 50% v/v e 1,0 mL de H_2O_2 30% v/v, e a mistura aquecida em forno de micro-ondas, conforme o programa mostrado na Tabela 2. Após o devido resfriamento, a solução da amostra foi transferida quantitativamente para um tubo de centrífuga de polipropileno graduado com capacidade de 15,0 mL, e o volume completado para 10,0 mL com água ultrapura. No caso dos materiais de referência, foram pesados 300 mg de cada amostra e submetidos ao mesmo procedimento de decomposição utilizado para as amostras.

Tabela 2 - Programa de aquecimento empregado na digestão ácida assistida por radiação micro-ondas

Etapa	Potência (W)	Rampa (min)	Patamar (min)
1	1280	10	25
2	0	0	15

2.2.5 Análise das amostras por TXRF

Para a análise das amostras digeridas, foi necessário um procedimento de preparo dos discos de quartzo que consistiu na lavagem com detergente neutro (Extran), enxague com água destilada e descontaminação em banho de HNO₃ 30% por, no mínimo, 24h. Em seguida, estes discos foram enxaguados com água deionizada e secos em estufa. Finalmente, a etapa de hidrofobização foi realizada pipetando-se 10 µL de uma solução de silicone em isopropanol em cada disco. A secagem do silicone foi realizada em estufa a 80°C por 30 min. Após esse procedimento, 10 µL de cada amostra foram depositados nos discos devidamente identificados. Estes discos foram levados ao dessecador, equipado com uma bomba de vácuo, a aproximadamente -0,8 atm por 20 minutos, para que o solvente evaporasse, permitindo então a formação de uma fina película uniformemente distribuída da amostra conforme apresentado na Figura 8.



Figura 8 - Disco de quartzo com fina película de amostra de leite digerido

Todas as análises foram realizadas no espectrômetro de fluorescência de raios X por reflexão total, S2 PICOFOX™ da Bruker com tubo de molibdênio. Para todas as análises quantitativas, o instrumento foi operado nas condições descritas na Tabela 3, com tempos de obtenção de dados variando de 250 a 1000 s. A interpretação dos espectros e a quantificação

dos analitos foram realizadas utilizando o software, SPECTRA 7.5.3 (Bruker), fornecido com o equipamento (S2 PICOFOX™).

Tabela 3 - Condições utilizadas para operação do S2 PICOFOX™

Parâmetro	Condição utilizada
Tubo de raios X	Molibdênio
Voltagem	50 kV
Corrente	600 μ A
Detector	Silicon-drift detector (SDD)
Resolução (Mn K α a 10 kcps)	< 150 eV
Atmosfera	ar
Temperatura	< 25°C

2.2.6 Otimização do padrão interno

Como já discutido anteriormente, a análise por fluorescência de raios X com reflexão total é feita através da calibração com padrão interno.

Uma otimização foi realizada para a escolha do melhor elemento para atuar como padrão interno (PI) na análise em questão. Como se sabe, o elemento escolhido não deve ocorrer naturalmente nas amostras e o seu sinal no espectro não deve interferir ou sofrer interferência de nenhum outro elemento presente na matriz a ser analisada. Baseando-se nesses requisitos, o gálio e o ítrio foram pré-selecionados para serem avaliados neste estudo.

Para essa avaliação foram digeridas 4 replicatas do material de referência de leite em pó (IAEA-153) com massa de 300 mg. Após a digestão, pipetou-se 1,00 mL de cada replicata para tubos Eppendorf devidamente identificados. Em seguida, diferentes quantidades das soluções padrão de Ga e Y foram adicionadas a cada replicata de modo que, ao final, apresentasse a configuração descrita na Tabela 4:

Tabela 4 - Concentrações dos padrões internos utilizadas em cada replicata

Replicata	Elemento usado como PI	Concentração final de PI (mg/kg)
1	Ga	18,3
2	Ga	108,0
3	Y	10,0
4	Y	100,0

Cada replicata foi analisada em três diferentes tempos de aquisição do sinal: 250, 500 e 1000 s. Com base nas concentrações obtidas para P, K, Ca, Cu, Zn, Rb, Sr e Br em cada condição e os valores certificados apresentados na Tabela 5, calculou-se as porcentagens de recuperação, que foram então utilizadas na escolha da condição ótima de análise.

Tabela 5 – Valores certificados no MRC IAEA-153

Elemento	Concentração (mg/kg)
P	10100
K	17620
Ca	12870
Cu	0,57
Zn	39,56
Rb	14,03
Sr	4,09
Br	12,32

2.2.7 Análise e comparação do teor de nutrientes em leites com diferentes características

Para a comparação dos leites, as amostras de leite cru, integral, desnatado, semidesnatado, semidesnatado enriquecido com Ca e semidesnatado com baixo teor de lactose foram analisadas. Estas amostras foram digeridas segundo o procedimento descrito no item 2.2.4. Adicionou-se então o padrão interno escolhido no item 2.2.6 na concentração de melhor resposta, preparou-se os discos e analisou-se as amostras na condições já descritas anteriormente.

Foi analisado também o material de referência IAEA-153 para se avaliar a precisão e veracidade do método.

Para a Análise de Componentes Principais, os dados (concentrações dos analitos) foram autoescalados utilizando-se o Excel e posteriormente analisados usando o software Estatística da StatSoft.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Otimização do padrão interno

Para avaliação da melhor condição de análise, os resultados obtidos após as análises das amostras descritas na Tabela 4 foram comparados e são apresentados nas Figuras 9, 10 e 11. Os analitos utilizados nessa avaliação foram aqueles cujas concentrações foram certificadas no MRC e que podem ser quantificados por TXRF (P, K, Ca, Cu, Zn, Rb, Sr e Br). Calculou-se a porcentagem de recuperação de cada analito em cada condição e considerou-se como adequadas recuperações entre 80 e 120 %.

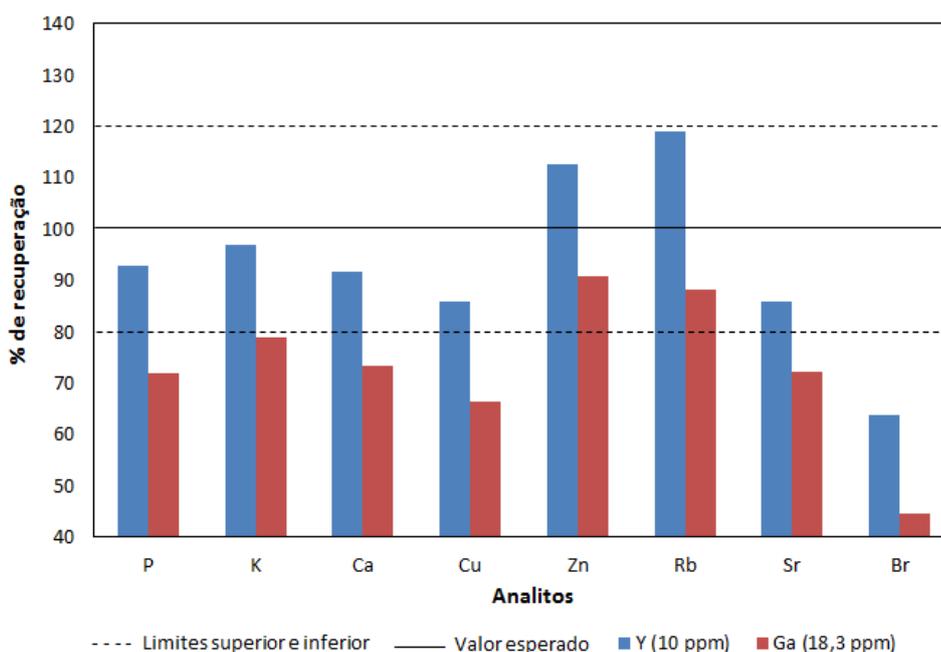


Figura 9 - Comparação dos valores de recuperação quando utilizado Y e Ga como padrão interno com tempo de aquisição de 250 s.

Comparando-se os resultados obtidos usando Ga e Y como padrões internos nas concentrações de 18,3 e 10,0 mg/L, respectivamente e tempo de aquisição de 250 segundos (Figura 9) verifica-se que o elemento Y apresentou melhor resultado como padrão interno. Com exceção do Br, que obteve valores de recuperação abaixo de 80% para os dois PI, todos os outros analitos estudados alcançaram recuperações satisfatórias. Ao se usar o Ga como padrão interno, apenas os elementos Zn e Rb apresentaram recuperações superiores a 80%. Além disso, todos os analitos apresentaram valores de recuperação mais baixos que quando o Y foi utilizado.

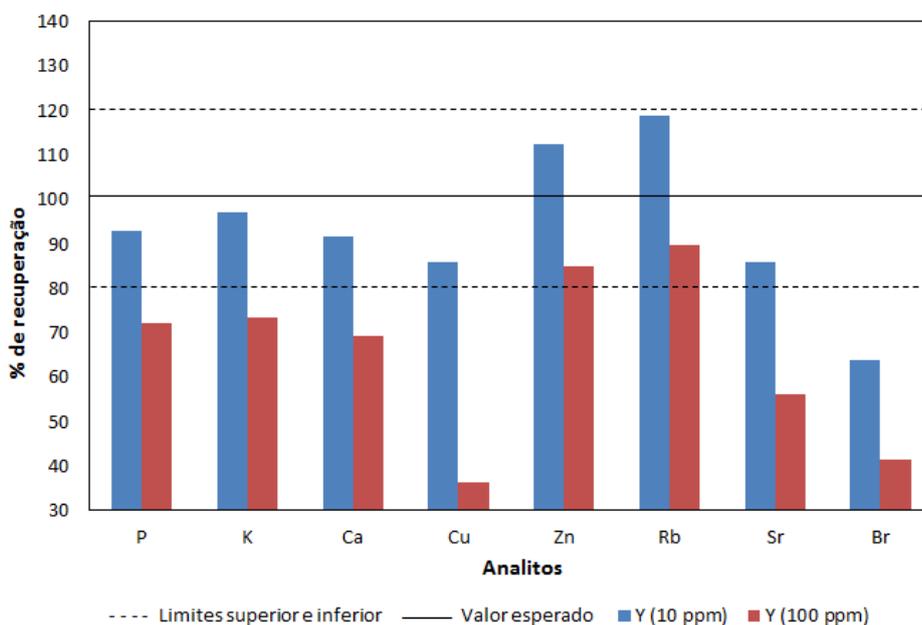


Figura 10 - Comparação dos valores de recuperação utilizando concentrações diferentes de Y como padrão interno e tempo de aquisição de 250 s.

Em função da concentração de padrão interno utilizada (Figura 10), pode-se observar que a amostra com Y na concentração de 100 mg/L apresentou valores de recuperação inferiores à recuperação quando se usou da amostra com Y 10 mg/L (principalmente para os elementos em baixíssimas concentrações como o cobre). Novamente, apenas as recuperações dos analitos Zn e Rb estavam acima do limite inferior de 80%. Com isso, pode-se concluir que o elemento utilizado como padrão interno que resulta em valores de recuperação mais próximos dos 100% é o Y quando utilizado na concentração de 10 mg/L.

Sendo assim, utilizou-se os resultados obtidos nessa condição (10 mg/L de Y) para se avaliar o efeito do tempo de aquisição do sinal na recuperação dos analitos (Figura 11).

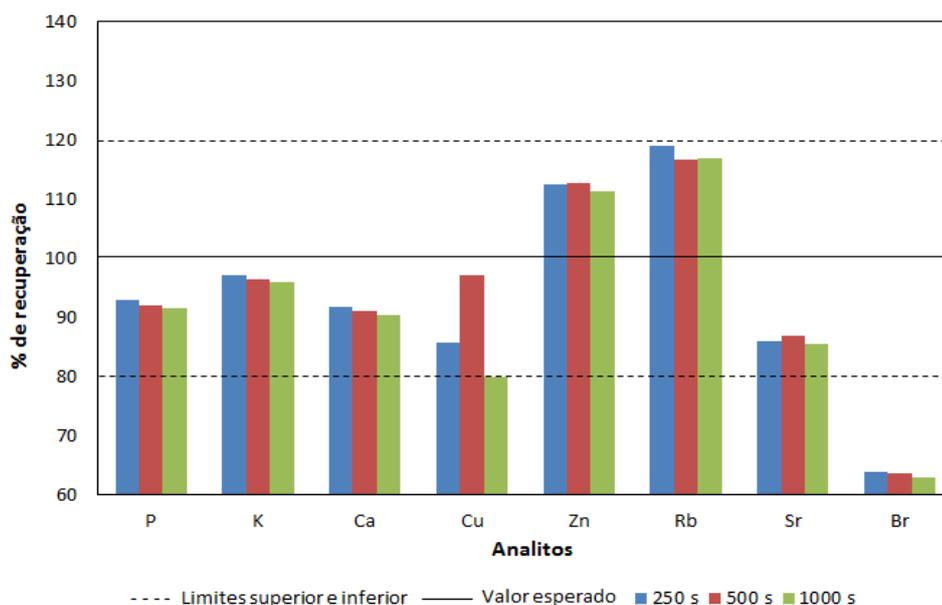


Figura 11 - Comparação dos tempos de leitura da amostra contendo Y 10 µg/L como padrão interno

Para todos os três tempos de leitura testados, os valores de recuperação se apresentaram dentro da faixa aceitável e muito próximos entre si. No caso do Br, os valores foram coincidentes e, como nas outras comparações, abaixo do limite inferior. Somente para o Cu houve diferença entre as recuperações em tempos diferentes. No entanto, os três valores foram aceitáveis. Dessa forma optou-se por utilizar o tempo de leitura de 250 segundos, uma vez que não houve diferença significativa, podendo assim, agilizar as análises.

2.3.2 Comparação do teor de nutrientes de leites com diferentes características

A título de ilustração, na Figura 12, é apresentado um espectro de raios X obtido a partir de uma amostra de leite cru digerida, analisada por TXRF. Como pode-se verificar este espectro apresenta picos de Al, P, S, Cl, K, Ca, Fe, Co, Cu, Zn, Br, Rb, Sr e Y (padrão interno). O pico de Si é devido ao porta amostras utilizado que é de quartzo e o de Ar se deve à presença deste gás no ar.

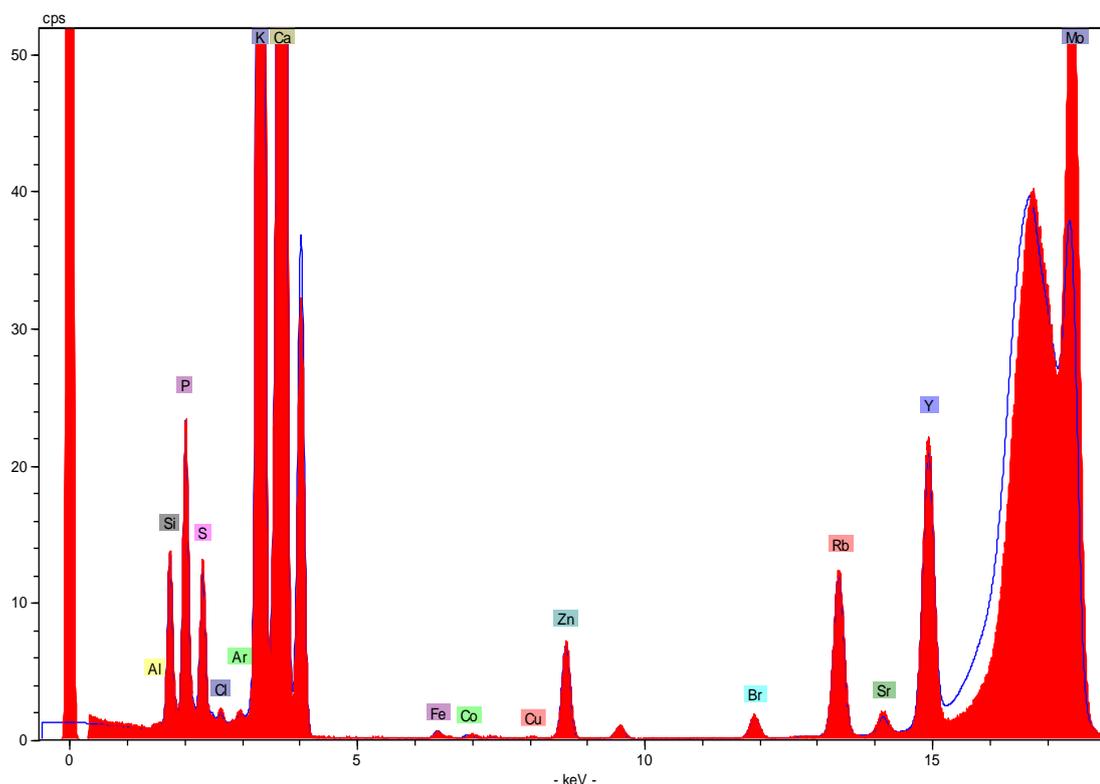


Figura 12 – Espectro dos raios X obtido por TXRF proveniente da amostra de leite cru digerida

Para se avaliar a veracidade e precisão do método utilizado foi analisado o MRC IAEA-153, cujos resultados são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Resultados obtidos na avaliação da veracidade e precisão do método empregando TXRF para análise de nutrientes minerais em leite

Analito	Conc. Obtida $X \pm s$ (mg/kg)	DPR (%)	Valor certif. (mg/kg)	Recuper. (%)	LD $X \pm s$ (mg/kg)
P	8711 \pm 1194	13,7	10100	86,2	28,5 \pm 4,5
K	16539 \pm 898	5,43	17620	93,9	4,86 \pm 0,84
Ca	11425 \pm 589	5,16	12870	88,8	3,10 \pm 0,57
Cu	0,520 \pm 0,050	10,4	0,570	90,7	0,177 \pm 0,049
Zn	45,0 \pm 1,3	2,82	39,6	114	0,155 \pm 0,043
Rb	16,6 \pm 0,2	1,16	14,0	118	0,116 \pm 0,029
Sr	3,55 \pm 0,06	1,66	4,09	86,8	0,140 \pm 0,035
Br	7,84 \pm 0,06	0,708	12,3	63,6	0,103 \pm 0,027

A recuperações foram satisfatórias tendo variado de 86,2 a 118 % para os analitos avaliados, com exceção de Br que apresentou uma recuperação de 63,6%. Em termos de precisão, o desvio padrão relativo variou de 0,708 a 13,7 %, sendo também considerada adequada para a finalidade pretendida.

Afim de se comparar os diferentes tipos de leites, calculou-se a média e o desvio padrão para cada conjunto de amostras do mesmo tipo (integral, desnatado, semidesnatado e enriquecido com Ca) e construiu-se os gráficos apresentados na Figura 13. Para leite cru e com baixa lactose foi analisada apenas uma amostra e apenas o valor dessa amostra é apresentado nos gráficos.

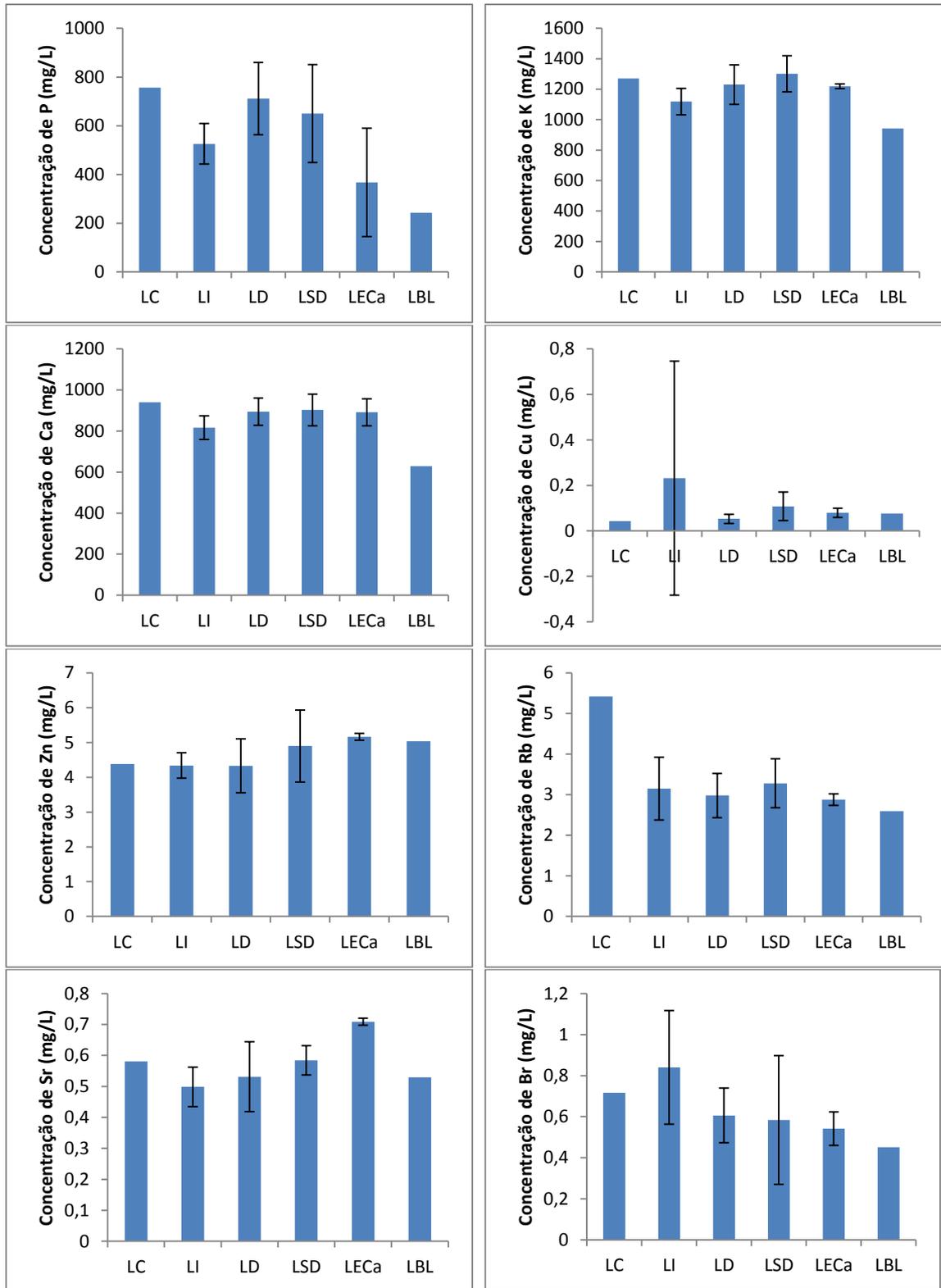


Figura 13 - Teores de P, K, Ca, Cu, Zn, Rb, Sr e Br, e desvios padrão nos diferentes tipos de leite: LC (leite cru), LI (leite integral), LD (leite desnatado), LSD (leite semidesnatado), LECa (leite enriquecido com Ca) e LBL (leite com baixo teor de lactose).

Cada gráfico da Figura 13 apresenta as médias e desvios padrão para um dado elemento em cada um dos seis diferentes leites analisados. A princípio observa-se que os teores de todos os elementos estudados (exceto Zn) são inferiores na amostra de leite com baixo teor de lactose (LBL) em relação aos demais tipos de leite.

No caso do leite semidesnatado enriquecido com Ca (LECa) os teores de Sr e Zn se apresentaram maiores que no restante dos leites. Esperava-se neste caso, obter uma concentração de Ca elevada em comparação com aos demais leites, no entanto, observou-se que o teor deste analito tem valores muito próximos em todas as amostras (com exceção da amostra LBL). Uma possível explicação para este fato, seria a precipitação de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Esse fato é corroborado pelo baixo teor de P encontrado nessas amostras de leite enriquecido com Ca.

Os resultados obtidos para o leite semidesnatado (LSD) apresentaram valores próximos aos do leite desnatado (LD) para todos os elementos. No entanto, pode-se observar que o desvio padrão do Br se mostrou muito elevado para o LSD. O leite integral (LI) se destaca dos demais leites por apresentar valores elevados de Cu, Br e seus respectivos desvios padrão. Já na análise do leite cru, obteve-se as maiores concentrações para P, K, Ca e Rb.

No gráfico das concentrações de Zn pode-se notar que as amostras de leite semidesnatado (LSD, LECa e LBL) apresentam concentrações muito próximas e ao mesmo tempo superiores às concentrações de Zn nos demais leites (LC, LI e LD). Por fim, é possível relacionar as concentrações de Ca e K observando os respectivos gráficos, que apresentam comportamento similar, apesar de valores de concentrações diferentes.

Para se avaliar um possível agrupamento das amostras, aplicou-se o método multivariado de Análises de Componentes Principais (PCA). Como ferramenta de análise exploratória a PCA permite revelar a existência ou não de amostras anômalas, de relações entre as variáveis medidas e de relações ou agrupamentos entre amostras.

O pré-processamento utilizado para esses dados foi o autoescalamento que torna todas as variáveis adimensionais, fazendo com que todas elas exerçam influências equivalentes. Para isso, os dados são centrados na média dos valores subtraindo-se o valor de cada dado da média de cada variável. Em seguida os dados são normalizados pelo desvio padrão dividindo-se o valor de cada dado centrado na média pelo desvio padrão da variável.

Os resultados obtidos para componentes principais, os autovalores e as porcentagens da variância explicada pelos componentes encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7 - Autovalor, variância e variância acumulada de cada componente principal referentes aos elementos presentes nos leites

Componente principal	Autovalor	Variância (%)	Variância acumulada (%)
1	2,63	32,91	32,91
2	2,22	27,77	60,69
3	1,50	18,80	79,49
4	0,90	11,24	90,73
5	0,41	5,12	95,84
6	0,20	2,47	98,31
7	0,07	0,94	99,25
8	0,06	0,75	100,00

De acordo com esses resultados, a primeira componente principal (PC1) explica 32,91 % da variância, a segunda componente (PC2) explica 27,77 % e a terceira (PC3) explica 18,80 %, resultando num total de 79,49 % da explicação da variância total nos analitos dos leites analisados. Desse modo, pode-se simplificar a análise utilizando apenas as três primeiras componentes sem perda significativa de informação.

Na Figura 14, estão apresentados três gráficos (escores e pesos) em que são relacionados PC1 e PC2 em (A), PC1 e PC3 em (B), e finalmente PC2 e PC3 em (C). Apesar de não ser observada uma separação efetiva dos diferentes tipos de leite, pela análise dos gráficos dos escores das Figuras 14 (A) e (B) pode se observar que a maior parte das amostras de leite integral (LI) estão agrupadas e possuem valores negativos na PC1. Ao se observar o gráfico de pesos da Figura 14 (A), conclui-se que as amostras deste grupo possuem maiores concentrações de Cu e Br, o que pode ser confirmado pelos outros dois gráficos. No caso das amostras de leite desnatado, também ocorreu um agrupamento e, apesar de estarem bem próximas ao grupo de leite integral, possuem valores na PC1 mais próximos ao zero e aos valores positivos.

As amostras de leite semidesnatado não apresentaram um comportamento padrão, uma vez que as três se mostraram bem diferentes entre si, em termos de concentrações dos analitos. Já as amostras de leite semidesnatado enriquecido com Ca se mostraram semelhantes entre si, porém, ao se analisar os gráficos de pesos, pode-se observar que o seu distanciamento dos outros grupos, se deve muito mais ao alto teor de Zn que propriamente o de Ca, já que as concentrações obtidas para o Ca foram semelhantes às das outras amostras.

A amostra de leite semidesnatado com baixo teor de lactose se mostrou isolada de todas as outras nos gráficos (A) e (B). Pode-se concluir então que esse leite é o que mais se diferencia de todos os tipos estudados, por apresentar concentrações mais baixas dos analitos. Como apenas uma amostra desse leite foi analisada não se pode inferir se esse comportamento é geral. Outras amostras de leite com baixa lactose serão analisadas para se avaliar se realmente esse leite tem menor quantidade de nutrientes.

Por fim, o leite cru apresentou um comportamento não esperado, uma vez que está situado mais próximo ao grupo dos leites desnatados que o grupo dos integrais.

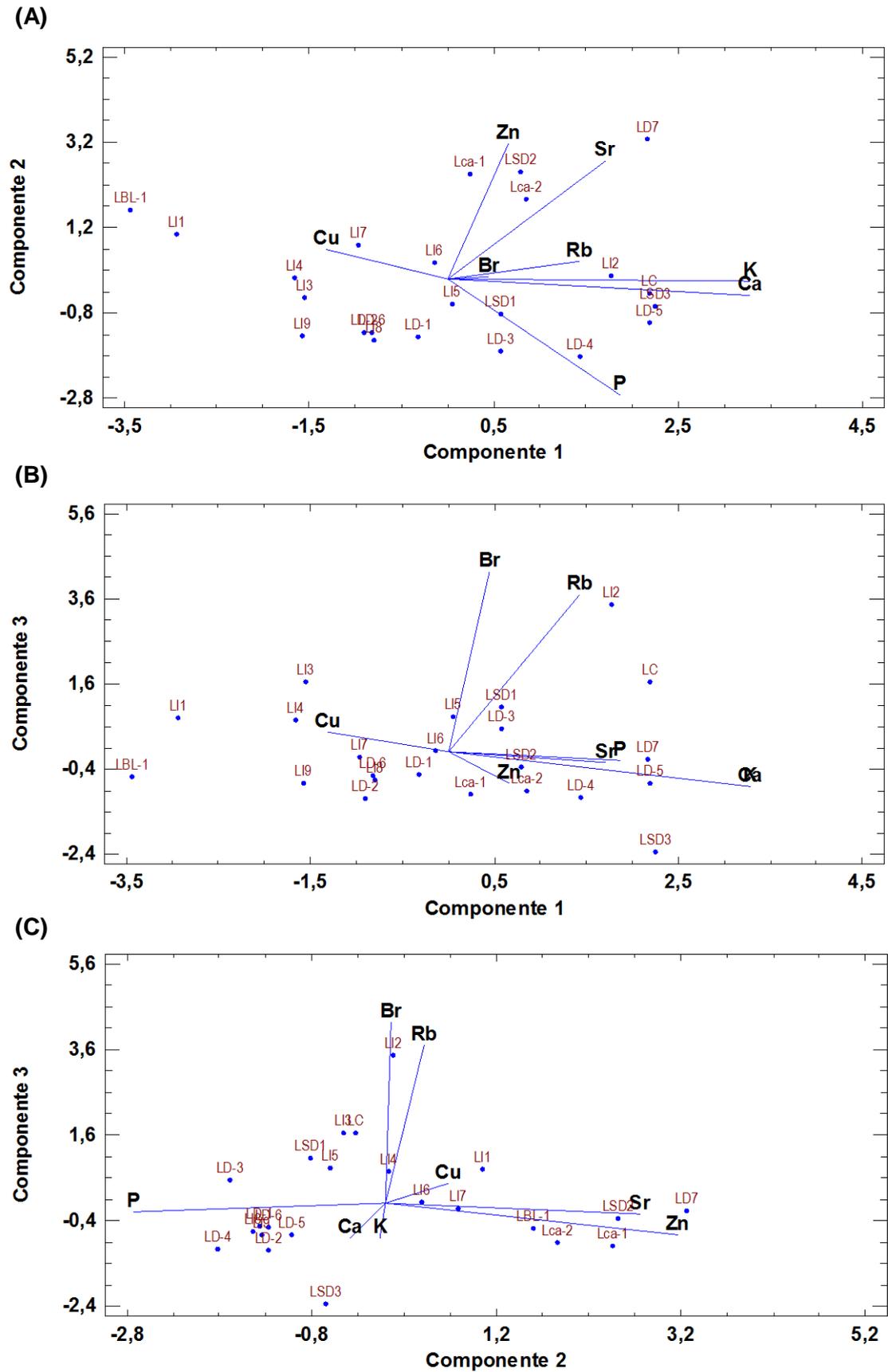


Figura 14 - Gráficos dos escores e pesos obtidos por PCA para leites de teores diferentes de gordura. (A) PC1 x PC2. (B) PC1 x PC3. (C) PC2 x PC3.

CAPÍTULO 3

Quantificação de chumbo no leite

3.1 Introdução

Para análise por TXRF, é necessário que a amostra líquida seja depositada no centro do porta amostras e então seca formando uma fina película. O leite, por conter alto teor de gordura, ao secar, forma um depósito heterogêneo e de espessura acima do recomendado. Ao analisar esta amostra, além de não se obter resultados reprodutíveis devido à heterogeneidade, corre-se o risco da película atingir o detector do equipamento, podendo ocorrer a contaminação deste.

Para contornar este problema, é necessário um tratamento das amostras que seja capaz de decompor a matriz orgânica. Para isso, optou-se por realizar a digestão do leite cru empregando um forno de micro-ondas com frasco fechado utilizando HNO_3 e H_2O_2 . Durante o processo de digestão, ocorre a irradiação de ondas eletromagnéticas denominadas micro-ondas. Quando um material não transparente às micro-ondas absorve este tipo de radiação, o material pode sofrer um aumento considerável na sua temperatura devido à interação da radiação eletromagnética com os íons dissolvidos e com o solvente, provocando migração iônica e rotação de dipolos. A ocorrência destes dois processos resulta em um movimento molecular no material, que também contribui para o aquecimento do mesmo (KRUG, 2010).

Dessa forma, esta técnica proporciona decomposições mais rápidas e seguras do que aquelas baseadas em sistemas abertos. Além disso, o uso de recipientes fechados, minimiza a possibilidade de contaminação durante o processo e diminui o número e quantidade de reagente necessário para a decomposição da matriz e solubilização da amostra.

Após a obtenção do digerido, foi estudado o procedimento de pré-concentração do chumbo. Para isso, foi necessário utilizar o complexante O,O-dietil ditiofosfato de amônio (DDTP) (Figura 15) que possui alta resistência à hidrólise, podendo ser usado em meios altamente ácidos. A adição deste reagente permite a formação de um quelato altamente hidrofóbico a fim de promover a captura do analito no interior das estruturas micelares.

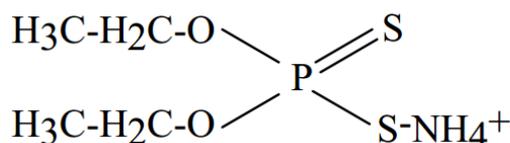


Figura 15 - Estrutura do complexante O,O-dietilditiofosfato de amônio (DDTP)

- Octilfenoxipolietoxietanol (Triton X-114), Sigma-Aldrich.
- Álcool etílico, C₂H₆O 95% PA ACS, Ecibra.
- Acetona pura, C₃H₆O PA, Cromato Produtos Químicos.
- Soluções estoque de Pb, Ga e Y de 1000 mg/L, Fluka.

Todas as soluções foram preparadas utilizando-se água deionizada com resistividade de 18,2 MΩ cm, purificada em sistema Milli-Q[®] da Millipore e foram acondicionadas em frascos de polipropileno.

3.2.2 Amostras

As amostras de leite cru foram coletadas no Centro de Produção Sustentável Fazenda Modelo Pedro Leopoldo da Escola de Veterinária da UFMG que está localizada no município de Pedro Leopoldo. Após a coleta, o leite foi dividido em alíquotas de 50 mL e armazenados em freezer.

3.2.3 Equipamentos e acessórios

- Espectrômetro de fluorescência de raios X por reflexão total, marca Bruker, modelo S2 Picofox[™];
- Purificador de ácidos, marca Milestone, modelo DuoPUR Subboiling Destillation System;
- Purificador de água, marca Millipore, modelo Milli-Q[®] Element;
- Forno de micro-ondas, marca Anton-Paar, modelo Multiwave 3000[®];
- Balança Analítica, marca Shimadzu, modelo AUW220D;
- Centrífuga da marca Fanem Excelsa[®] II, modelo 206 BL;
- Micropipetas de 5000, 1000, 200, 100 e 20 µL;
- Tubos de centrífuga de polipropileno com capacidade de 15 e 50 mL;
- Chapa aquecedora, marca IKA[®] RH Basic 1;
- Dessecador;
- Bomba de vácuo, marca Millipore;
- Papel Indicador Universal pH 0-14, marca Merck;
- Porta amostras de quartzo.

3.2.4 Otimização do método de extração em ponto nuvem

Todos os experimentos de pré-concentração em ponto nuvem foram realizados utilizando as soluções resultantes da digestão ácida do leite cru. Estas soluções foram obtidas a partir do mesmo procedimento descrito no capítulo 2. Para isso, antes do procedimento de digestão, as amostras pipetadas para o frasco de quartzo foram contaminadas com 250 μL de solução padrão de Pb 1,0 mg/L a fim de se obter uma concentração final de 100 $\mu\text{g/L}$ de Pb no leite cru.

Para a complexação do Pb pelo DDTP foi necessária a adição de aproximadamente 150 μL da solução de NaOH 5 mol/L para corrigir o pH do digerido. Com o auxílio de papel indicador universal, foi possível assegurar que o pH se encontrava entre 1 e 2, e só então adicionar as soluções de DDTP 2% m/v e Triton X-114 5% m/v. A solução final foi então aquecida em banho-maria a 50°C por 15 minutos. A separação de fases foi acelerada pela centrifugação dos tubos a 3000 rpm por 10 minutos. Em seguida, as soluções foram estocadas em uma geladeira por aproximadamente 30 minutos para facilitar a separação manual das fases. Foram adicionados às fases ricas 25 μL de solução padrão de Ga 100 mg/L para atuar como padrão interno nas análises por TXRF. Por fim, as fases ricas foram eluídas em uma solução de HNO_3 0,1 mol/L em etanol 95% v/v, até o volume final de 1,0 mL.

A fim de se avaliar as melhores condições de trabalho e obtenção de elevados percentuais de extração, foi realizado um planejamento de experimentos no procedimento de extração em ponto nuvem, onde as variáveis estudadas foram: volume da solução do complexante DDTP 2% m/v e volume da solução do surfactante Triton X-114 5% m/v. Neste estudo foi aplicado um planejamento de composição central 2^2 em que os pontos axiais estão localizados a uma distância $\alpha = \sqrt{2}$ a partir do centro. Os níveis estudados estão apresentados na Tabela 8 a seguir.

Tabela 8 - Níveis estudados no planejamento composto central com $\alpha = \sqrt{2}$

Fatores da extração	Níveis estudados				
	-1,414	-1	0	+1	+1,414
Vol. DDTP (mL)	0,276	0,400	0,700	1,000	1,124
Vol. Triton X-114 (mL)	0,147	0,250	0,500	0,750	0,850

Para a análise das amostras obtidas nesta etapa de extração, os discos de quartzo foram descontaminados e preparados como descrito no item 2.2.5 capítulo 2.

3.2.5 Estudo de veracidade e precisão

Foram realizados experimentos para o estudo da exatidão/precisão do método de determinação de chumbo por TXRF associado à extração em ponto nuvem. Para isso, os procedimentos de digestão de amostras utilizado é o mesmo descrito no capítulo 2, e os procedimentos de pré-concentração do analito e leitura no espectrômetro são os mesmos descritos no item 3.2.4 deste capítulo. A contaminação das amostras com Pb foi feita em três diferentes níveis: 20, 50 e 100 µg/L, adicionando-se respectivamente 50, 125 e 250 µL de solução padrão de Pb 1,0 mg/L, sendo que para cada nível, quatro replicatas foram preparadas.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Otimização do método de extração em ponto nuvem

O planejamento composto central do tipo estrela proposto é adequado para avaliar o efeito de algumas variáveis simultaneamente e permite a introdução de termos quadráticos ao modelo, fundamentais para a descrição de superfícies de resposta curvas. Com essas ferramentas é possível investigar a influência e a forma de interação entre essas variáveis no processo de extração em ponto nuvem, bem como estabelecer os valores que maximizem as respostas esperadas, obtendo assim os resultados ótimos.

A otimização foi realizada diretamente no digerido de amostras de leite fortificado para evitar possíveis interferências posteriores. Nesta etapa, optou-se por utilizar uma concentração de Pb maior do que a estabelecida na legislação com o intuito de se obter sinal analítico em todos os experimentos.

Neste estudo, o planejamento resultou em 13 experimentos que estão apresentados na Tabela 9, juntamente com o sinal de Pb obtido para cada amostra.

Tabela 9 - Matriz do planejamento experimental e resultados para sinal de Pb

Experimento	TX-114	DDTP	Sinal Pb (área)
1	+1	+1	28080
2	+1	-1	1826
3	-1	+1	25300
4	-1	-1	2444
5	0	0	878
6	0	0	1307
7	0	0	7045
8	0	0	1268
9	+1,414	0	10636
10	-1,414	0	24780
11	0	+1,414	1284
12	0	-1,414	1682
Branco	0	0	912

Para a avaliação das variáveis significativas, foi feito um tratamento estatístico com os dados obtidos, utilizando o software Statística da StatSoft, que gerou o gráfico de pareto dos efeitos padronizados representado na Figura 17.

Como pode ser observado no gráfico, os dois parâmetros avaliados possuem efeitos lineares e quadráticos significativos sobre o sinal de Pb no domínio estudado ($p < 0,5$), sendo que o efeito quadrático positivo do volume de TX-114 é o de maior significância estatística. Já o efeito linear do parâmetro relacionado ao volume de TX-114 apresentou influência negativa, indicando que dentro de uma certa faixa do domínio experimental, o aumento da quantidade do surfactante reduz o sinal analítico líquido para Pb ao final do procedimento de extração. O aumento do volume de fase rica diminui os fatores de pré-concentração. Entretanto, neste estudo, em todos os experimentos o volume da fase rica foi diluído para 1,0 mL com etanol. O efeito negativo é então possivelmente devido ao maior sinal de fundo (background), que aumenta com a quantidade de triton na solução analisada. Esse efeito pode ser compensado por maiores fatores de pré-concentração, que são favorecidos por maiores volumes do agente complexante. Isso pode ser observado pelo efeito linear positivo do parâmetro referente ao volume de DDTP que indica que há uma tendência de maior extração do Pb quando se eleva o volume da solução do complexante. Por fim, o gráfico indica significância no efeito de

interação entre os parâmetros estudados, que é esperada em função dos efeitos do Triton e do DDTP já discutidos.

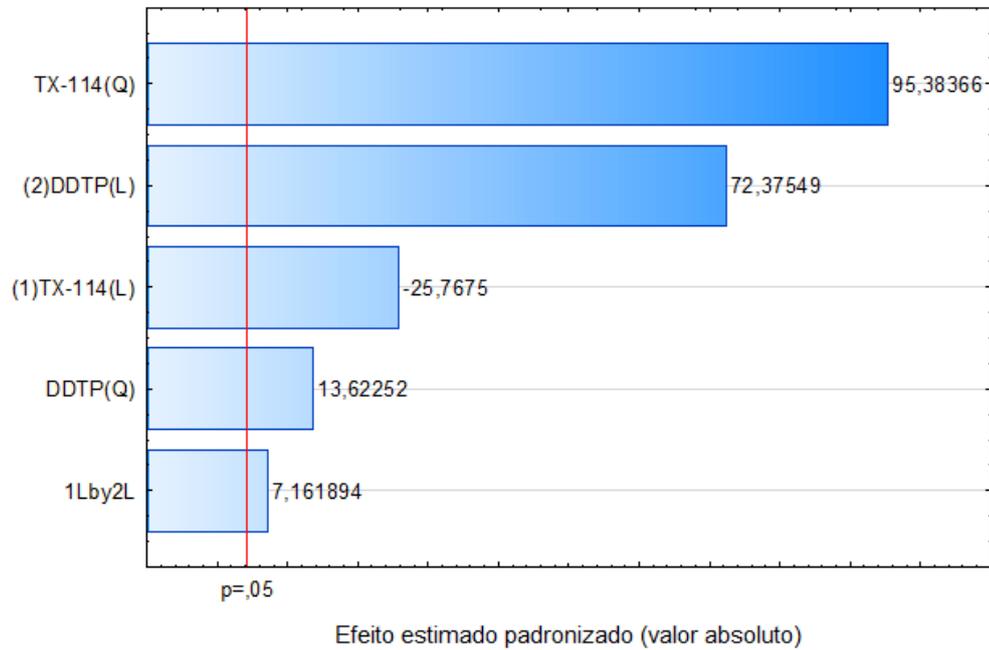


Figura 17 - Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados. Variável: Sinal Pb

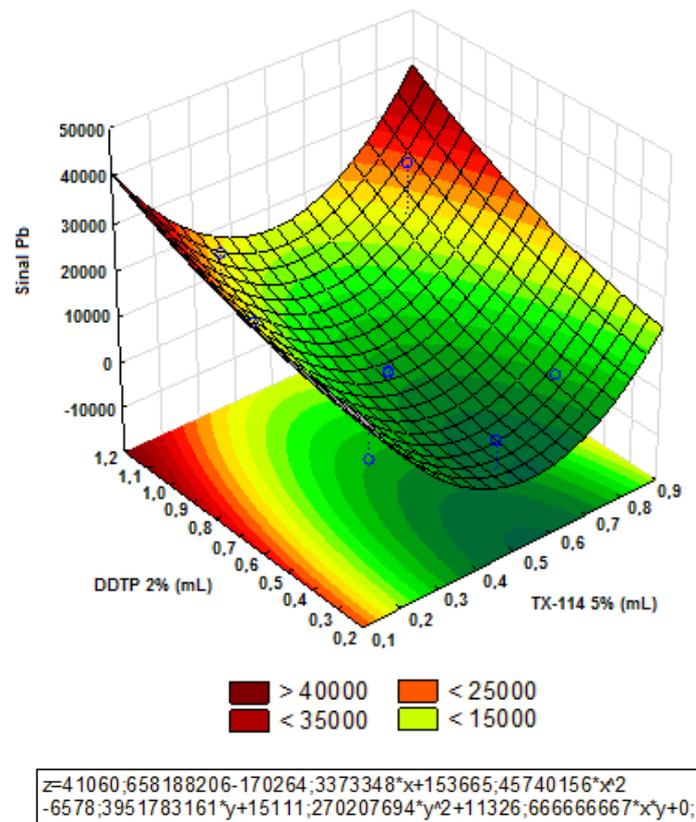


Figura 18 - Gráfico da superfície de resposta. Variável: Sinal Pb

A Figura 18 representa a superfície de resposta para os resultados obtidos do planejamento, tendo-se o sinal de Pb em função das variáveis estudadas.

A inspeção visual da superfície permite a avaliação do efeito que as variáveis independentes exercem sobre a concentração final de Pb na fase rica da extração. De acordo os resultados, nota-se que os sinais de Pb são maiores quando se usa uma quantidade maior de DDTP 2% m/v, mostrando que o aumento da quantidade de complexante leva à formação efetiva do complexo de Pb, favorecendo a pré-concentração. O Pb, na forma iônica, não é capaz de interagir com as micelas, não sendo separado então na fase rica. Quanto ao volume de TX-114 5% m/v, pode-se observar que os melhores resultados ocorrem nas extremidades do eixo referente às quantidades do surfactante. Como a separação e recuperação da fase rica é mais difícil quando se utiliza volumes muito pequenos do surfactante, optou-se por trabalhar com volumes maiores. Dessa forma, os valores estabelecidos para o procedimento de pré-concentração do Pb foram: 1,0 mL de DDTP 2% m/v e 0,75 mL de TX-114 5% m/v. Isso corresponde à concentrações finais em torno de 0,17 % m/v de DDTP e 0,31% m/v de TX-114 na solução da amostra.

3.3.2 Avaliação das figuras de mérito

Veracidade e precisão

Durante o procedimento de extração em ponto nuvem executado para o estudo da veracidade e precisão, os volumes de complexante e surfactante adicionados foram os otimizados anteriormente e o Ga utilizado como padrão interno na concentração de 1,0 mg/L. Os primeiros resultados obtidos não foram satisfatórios, pois apresentaram valores de recuperação por volta de 35 %, estando muito abaixo de 80 %. Avaliando-se os espectros (Figura 19), percebeu-se que o pico do Ga estava sobrepondo-se ao pequeno pico do Pb, resultando em interferência. Para resolver esse problema, optou-se por realizar novos testes, alterando-se o padrão interno de gálio para ítrio na concentração de 10 mg/L. A linha $L\alpha$ do Pb tem energia de 10,55 keV e a $K\alpha$ do Y 14,96 keV, não havendo assim, problemas de interferência no espectro. Observou-se então, a melhora significativa nos novos valores de concentração de Pb.

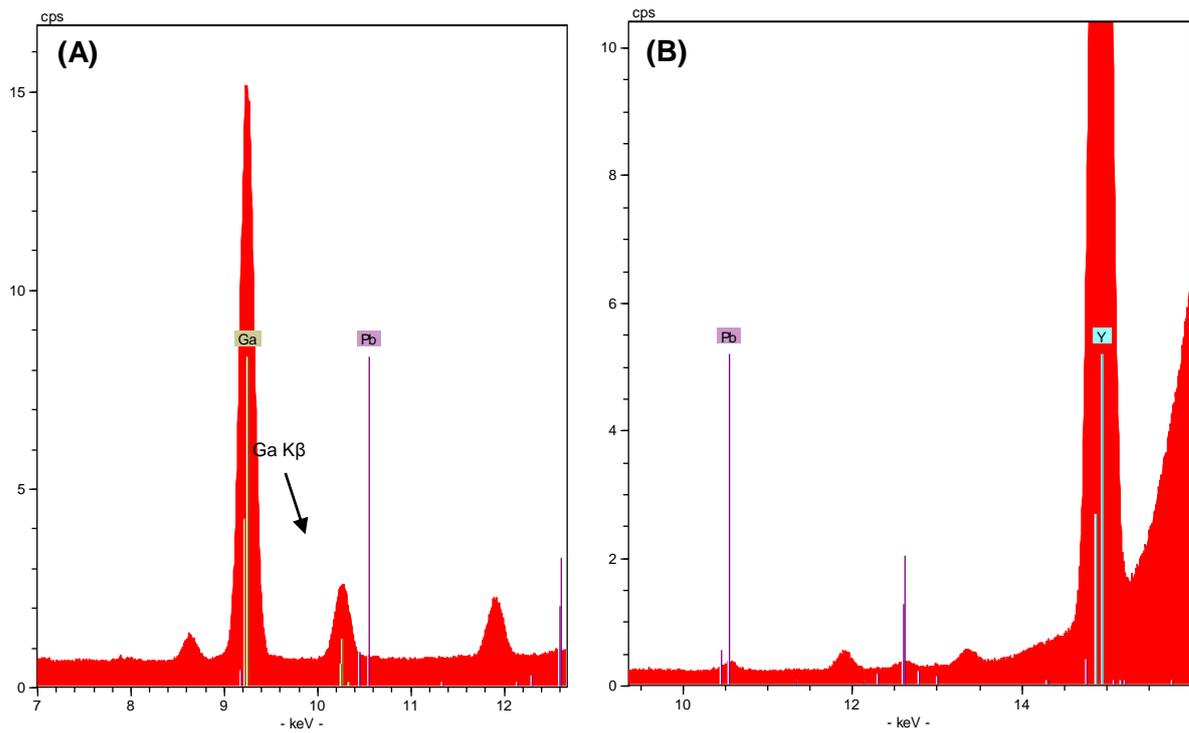


Figura 19 - Espectros de raios X para amostra de leite após pré-concentração do Pb. (A) Ga como padrão interno. (B) Y como padrão interno

A partir dos resultados obtidos para as quadruplicatas das amostras fortificadas com Pb em três níveis de concentração (20, 50 e 100 $\mu\text{g/L}$), calculou-se a porcentagem de recuperação para a avaliação da veracidade do método proposto. Já para avaliar a precisão do método, foi calculado o desvio padrão relativo para cada grupo nível de concentração, como apresentado na Tabela 10.

Tabela 10 - Valores de recuperação de Pb em leite empregando o método proposto

Concentração esperada (µg/L)	Replicata	Concentração encontrada (µg/L)	Recuperação (%)	Média (%)	Desvio Padrão Relativo (%)
20	A	19,49	97,5	103	7,0
	B	21,01	105		
	C	19,37	96,8		
	D	22,43	112		
50	A	49,27	98,5	89,8	10,0
	B	48,25	96,5		
	C	40,41	80,8		
	D	41,66	83,3		
100	A	91,21	91,2	92,0	8,5
	B	92,83	92,8		
	C	101,5	102		
	D	82,39	82,4		

As porcentagens médias de recuperação variaram de 89,8 a 103 % para os níveis estudados. Verifica-se uma boa recuperação (103 ± 7 %) para a concentração de 20 (µg/L), que é o limite máximo estabelecido pela legislação para Pb em leite. De acordo com os critérios de aceitação definidos pela Comissão Europeia (EC, 2002), que estabelecem recuperações entre 80 e 110% para concentrações maiores que 10 µg/L, apenas a replicata D do primeiro nível de concentração está acima do intervalo, mas em média todos os resultados foram satisfatórios.

Já para a precisão, os valores dos desvios padrão relativos para os três níveis variaram entre 7,0 a 10,0 %, estando de acordo com o critério de aceitabilidade definido pela Comissão Europeia, que estabelece um desvio padrão relativo de até 20 % para concentrações entre 10 e 100 µg/L

Limite de detecção

Como não se trabalha com curvas de calibração na técnica TXRF não é possível determinar os limites de detecção e quantificação pelos métodos convencionais que levam em conta a inclinação (IUPAC) ou equação (INMETRO) da curva de calibração.

Desta forma, os limites de detecção das amostras analisadas para o estudo de veracidade e precisão foram calculados pelo software SPECTRA 7.5.3 (Bruker), fornecido com o equipamento (S2 PICOFOX™), segundo a equação 6, que já foi apresentada no capítulo 1.

$$LD_i = \frac{3 \cdot C_i \cdot \sqrt{I_{BG}}}{I_i} \quad (6)$$

Na Tabela 11 são apresentados os limites de detecção obtidos para os níveis de concentração avaliados no estudo de veracidade e precisão.

Tabela 11 - Limites de detecção obtidos para o Pb na análise de leite cru pelo método proposto

Concentração (µg/L)	LD X ± s (µg/L)
20	2,0 ± 0,3
50	4,5 ± 2,5
100	5,8 ± 0,7

Dessa forma, pode-se comparar os valores obtidos e concluir que, com o aumento das concentrações de Pb nas amostras, ocorre também o aumento dos valores de LD. Este fato é confirmado pela equação 6, que indica uma relação de proporcionalidade entre a concentração e o limite de detecção do analito.

Dos níveis de concentração de Pb estudados, o de maior importância é o de 20 µg/L por ser o limite máximo permitido para chumbo em leite estabelecido pelo regulamento (CE) nº 1881/2006 e pelo CODEX STAN 193-1995, 2010. Nesse sentido, é interessante que o seu LD seja o menor possível, para se ter certeza do resultado final da análise. Dessa forma, com a utilização do procedimento de pré-concentração por extração em ponto nuvem nas amostras de leite cru, foi possível a obtenção de limites de detecção de Pb aproximadamente 4 vezes menores que os limites obtidos para as amostras sem etapa de pré-concentração.

Estimativa do fator de pré-concentração

Normalmente, para se determinar o fator de pré-concentração em métodos que empregam curva de calibração, calcula-se a razão entre as inclinações de uma curva que passou pela pré-concentração e de uma curva sem pré-concentração. Essa estratégia não é viável para análises por TXRF. Desta forma, para se ter uma estimativa do fator de pré-concentração obtido utilizando-se o procedimento de EPN, avaliou-se as contagens obtidas para amostras pré-concentradas e sem pré-concentrar.

Observou-se um aumento no sinal de fundo das amostras pré-concentradas (de aproximadamente 50%), possivelmente devido ao TX-114 que torna o meio mais viscoso. A estimativa do fator de pré-concentração foi feita com base no sinal analítico líquido (razão entre o sinal analítico de uma amostra que passou pelo procedimento de pré-concentração e amostra sem pré-concentrar) e ficou entre 4 e 5 vezes. Esse fator de pré-concentração poderia ser melhorado diminuindo-se a diluição final realizada com a fase rica. Entretanto, para a aplicação em questão, isso não é necessário pois a veracidade e precisão obtidas para a concentração de 20 µg/L foram satisfatórias.

CAPÍTULO 4

Considerações finais

Na primeira parte deste trabalho foi realizada uma avaliação da composição mineral de diferentes tipos de leites comerciais empregando a técnica de fluorescência de raios X por reflexão total. O preparo de amostra consistiu na digestão ácida por micro-ondas utilizando-se HNO_3 50 % v/v e H_2O_2 30 % m/v.

Uma vez que a análise por TXRF é feita através da calibração com padrão interno, foi realizada uma otimização para avaliação da melhor condição de análise, em relação ao elemento utilizado como PI, sua concentração na amostra e o tempo de leitura no equipamento. Alíquotas do material de referência de leite em pó IAEA-153 foram digeridas e contaminadas com diferentes concentrações de Y e Ga e analisadas com tempos de aquisição de 250, 500 e 1000s. Após a obtenção e comparação dos resultados, observou-se que o experimento com Y em concentração de 10 mg/L analisado por 250 segundos apresentou valores de recuperação mais próximos de 100 % para P, k, Ca, Cu, Zn, Rb, Sr e Br.

Com estes parâmetros definidos, realizou-se as determinações dos 8 elementos citados anteriormente, nos leites cru, integral, desnatado, semidesnatado, enriquecido com Ca e com baixo teor de lactose. Com a comparação das concentrações médias obtidas e seus respectivos desvios padrão e o auxílio do método multivariado de Análises de Componentes Principais (PCA), pôde-se observar um agrupamento das amostras de leite integral e outro com os leites desnatados, apesar de não apresentar uma separação efetiva dos diferentes tipos de leite. Além disso, a análise mostrou que o teor de Ca em leites enriquecidos com o elemento, não foi diferente dos valores obtidos para os outros leites, podendo supor a precipitação de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

Na segunda parte deste trabalho foi apresentado o desenvolvimento de uma metodologia para determinação de Pb em leite cru por TXRF. O método tem como principais vantagens a capacidade de análise multielementar simultânea de pequenas alíquotas (μL ou mg) apresentando limites de detecção na ordem de ppb.

Para o preparo das amostras de leite cru, foi proposta a combinação de digestão ácida por micro-ondas com a pré-concentração do Pb por extração em ponto nuvem, que se mostrou eficaz para a decomposição da matriz e obtenção de um filme fino ao depositar o digerido no disco de quartzo para análise.

A otimização da digestão ácida resultou na menor diluição possível do leite cru (4 vezes) utilizando-se o forno de micro-ondas com cavidade. Para a pré-concentração, a otimização realizada utilizando-se planejamento composto central avaliou os volumes de DDTP e Triton X-114, indicando efeitos lineares e quadráticos significativos para os dois

parâmetros. Dessa forma os valores ótimos foram 1,0 mL de DDTP 2% m/v e 0,75 mL de TX-114 5% m/v.

Os estudos de veracidade e precisão foram realizados em três níveis de concentração de Pb (20, 50 e 100 µg/L) e apresentaram valores médios de recuperação entre 89,8 e 103 %, que estão adequados ao limite máximo de 110 % estabelecido pela Comissão Europeia. Os valores dos desvios padrão relativos para os três níveis variaram entre 7,0 a 10,0 %, estando de acordo com o critério de aceitabilidade definido pela Comissão Europeia, que estabelece um desvio padrão relativo de até 20 % para concentrações entre 10 e 100 µg/L.

Dentre as concentrações estudadas, a de maior importância é 20 µg/L por ser o limite máximo permitido de chumbo em leite estabelecido pelo regulamento (CE) nº 1881/2006 e pelo CODEX STAN 193-1995, 2010. Nesse caso, o limite de detecção foi em média de 2,0 µg/L e o fator de pré-concentração ficou entre 4 e 5 vezes, justificando-se assim, o emprego do procedimento de extração em ponto nuvem do Pb.

CAPÍTULO 5

Referências Bibliográficas

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). Toxicological profile for lead. Atlanta, GA: U.S. **Department of Health and Human Services, Public Health Service**. 2007. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=96&tid=22>>. Acesso em: 30 dez. 2014.

BADER, N. R.; EDBEY, K.; TELGHEDER, U. Cloud point extraction as a sample preparation technique for trace element analysis: An overview. **Journal Of Chemical And Pharmaceutical Research**, Benghazi, v. 6, n. 2, p.496-501, 2014.

BARANOWSKA, I.; BARCHANSKA, H.; PYRSZ, A. Distribution of pesticides and heavy metals in trophic chain. **Chemosphere**, v. 60, n. 11, p. 1590-1599, 2005. ISSN 0045-6535.

BEZERRA, M. de A.; FERREIRA, S. L. C. Extração em ponto nuvem: princípios e aplicações em química analítica, **Vitória da Conquista: Edições UESB**, 2006, 165p

BORGES, D. L. G. et al. Cloud-point extraction for the determination of Cd, Pb and Pd in blood by electrothermal atomic absorption spectrometry, using Ir or Ru as permanent modifiers. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 18, n. 5, p. 501-507, 2003. ISSN 02679477.

BRASIL. Constituição (1996). Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite Uat (uht)**. Brasília, Disponível em: <http://www.sfdk.com.br/imagens/lei/Portaria_146_-_ANEXO_XII.htm>. Acesso em: 05 jan. 2015.

_____. Constituição(1997). Portaria nº 370, de 04 de setembro de 1997. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite Uht (uat)**. Brasília, Disponível em: <http://www.lex.com.br/doc_11361_PORTARIA_N_370_DE_4_DE_SETEMBRO_DE_1997.aspx>. Acesso em: 05 jan. 2015.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária E Abastecimento – MAPA. Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes. Brasília: **MAPA/ACS**, 2009. 23 p.

_____. Constituição (2011). Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. **Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade de Leite Tipo A**. Brasília, DF.

BRUKER (Ed.). **S2 Picofox**: User Manual. Berlim: Bruker, 2012. 118 p.

CHEN, J. and TEO, K. C. Determination of cadmium, Copper, lead and zinc in water samples by flame atomic absorption spectrometry after cloud point extraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 450, p. 215-222, 2001.

CODEX STAN 193-1995. Codex general standard for contaminants and toxins in food and feed. 2010. 41 p.

DA COSTA, R. et al. Trace elements content of colostrum milk in Brazil. **J. Food Compos. Anal.**, v. 15, n. 1, p. 27-33, 2002. ISSN 0889-1575.

DE LA CALLE, I. et al. Sample pretreatment strategies for total reflection X-ray fluorescence analysis: A tutorial review. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 90, p. 23-54, 2013. ISSN 05848547.

_____. Fast method for multielemental analysis of plants and discrimination according to the anatomical part by total reflection X-ray fluorescence spectrometry. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 234-241, 2013. ISSN 03088146.

DHARA, S.; MISRA, S. Application of total reflection X-ray fluorescence spectrometry for trace elemental analysis of rainwater. **Pramana - Journal of Physics**, v. 76, n. 2, p. 361-366, 2011. ISSN 03044289.

D'ILIO, S.; PETRUCCI, F.; D'AMATO, M.; DI GREGORIO, M.; SENOFONTE, O.; VIOLANTE, N. Method validation for determination of arsenic, cadmium, chromium and lead in milk by means of dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 624, p. 59-67, 2008.

DOS SANTOS DEPOI, F. et al. Preconcentration and determination of As, Cd, Pb and Bi using different sample introduction systems, cloud point extraction and inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Analytical Methods**, v. 4, n. 1, p. 89-95, 2012. ISSN 17599660.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA (Brasil). Embrapa Gado de Leite. Disponível em: <<http://www.cnpq.embrapa.br/>>. Acesso em: 15 dez. 2014.

FARIA, A. M.; QUEIROZ, M. E. L. R.; NEVES, A. A. EXTRAÇÃO POR PONTO NUVEM: TÉCNICA ALTERNATIVA PARA A EXTRAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS. **Pesticidas: R.ecotoxicol. e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 15, n. , p.29-42, jan. 2005.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. Faostat: Food and Agricultural commodities production. Disponível em: <[http:// http://faostat3.fao.org](http://faostat3.fao.org)>. Acesso em: 15 dez. 2014.

GUIMARÃES, D. et al. Lead concentration in feces and urine of exposed rats by X-ray fluorescence and electrothermal atomic absorption spectrometry. **X-Ray Spectrometry**, v. 41, n. 2, p. 80-86, 2012. ISSN 00498246.

JENSEN, R. (2002). Invited review: the composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. **Journal of Dairy Science**, 85, 295-350.

JORNAL OFICIAL DAS COMUNIDADES EUROPÉIAS. Regulamento (CE) nº 1881/2006 da Comissão de 19 de dezembro de 2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos gêneros alimentícios. Europa, 2006.

JUVONEN, R.; PARVIAINEN, A.; LOUKOLA-RUSKEENIEMI, K. Evaluation of a total reflection X-ray fluorescence spectrometer in the determination of arsenic and trace metals in

environmental samples. **Geochem.-Explor. Environ. Anal.**, v. 9, p. 173-178, 2009. ISSN 1467-7873.

KLOCKENKÄMPER, R.; VON BOHLEN, A. Elemental Analysis of Environmental Samples by Total Reflection X- Ray Fluorescence: A Review. **X-Ray Spectrometry**, v. 25, n. 4, p. 156-162, 1996. ISSN 00498246.

_____. Total- reflection X- ray fluorescence moving towards nanoanalysis: A survey. **Spectroc. Acta Pt. B.** 56: 2005-2018 p. 2001.

KNOTH, J.; SCHWENKE, H. An X-ray fluorescence spectrometer with totally reflecting sample support for trace analysis at the ppb level. **Fresenius; Zeitschrift für Analytische Chemie**, v. 291, n. 3, p. 200-204, 1978. ISSN 00161152.

KRUG, F.J.; Métodos de Preparo de Amostras: Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar, 1 ed., Edição do autor, Piracicaba: São Paulo, 2010.

KUMP, P. Some considerations on the definition of the limit of detection in X- ray fluorescence spectrometry. **Spectroc. Acta Pt. B-Atom. Spectr.**, v. 52, n. 3, p. 405-408, 1997. ISSN 0584-8547.

LAESPADA, M. E. F.; PAVÓN, J. L. P.; CORDERO, B. M. Micelle- mediated methodology for the preconcentration of uranium prior to its determination by flow injection. **The Analyst**, v. 118, n. 2, p. 209-212, 1993. ISSN 00032654.

LIU, Z. P. Lead poisoning combined with cadmium in sheep and horses in the vicinity of non-ferrous metal smelters. **The Science of the Total Environment**, v. 309, p. 117-126, 2003.

MAGES, M. et al. Zinc and cadmium accumulation in single zebrafish (*Danio rerio*) embryos - A total reflection X-ray fluorescence spectrometry application. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 63, n. 12, p. 1443-1449, 2008. ISSN 05848547.

MANZOORI, J. L.; KARIM-NEZHAD, G. Development of a cloud point extraction and preconcentration method for Cd and Ni prior to flame atomic absorption spectrometric determination. **Analytica Chimica Acta**, v. 521, n. 2, p. 173-177, 2004. ISSN 0003-2670.

MARANHÃO, T. D. A. et al. **Cloud point extraction for the determination of cadmium and lead in biological samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry.** 60: 667-672 p. 2005.

_____. Cloud point extraction for the determination of lead and cadmium in urine by graphite furnace atomic absorption spectrometry with multivariate optimization using Box- Behnken design. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 62, n. 9, p. 1019-1027, 2007. ISSN 05848547.

MARÇAL, W. S.; CAMPOS NETO, O.; NASCIMENTO, M. R. Valores sanguíneos de chumbo em bovinos nelore suplementados com sal mineral naturalmente contaminado por chumbo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 28, n. 1, p.53-57, 1998.

MARGUÍ, E.; ZAWISZA, B.; SITKO, R. Trace and ultratrace analysis of liquid samples by X-ray fluorescence spectrometry. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 53, p. 73-83, 2014. ISSN 01659936.

MESQUITA DA SILVA, M. A.; AZZOLIN FRESCURA, V. L.; CURTIUS, A. J. Determination of trace elements in water samples by ultrasonic nebulization inductively coupled plasma mass spectrometry after cloud point extraction. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 55, n. 7, p. 803-813, 2000. ISSN 0584-8547.

MOREIRA FÁTIMA, R.; MOREIRA JOSINO, C. A cinética do chumbo no organismo humano e sua importância para a saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 9, n. 1, p. 167, 2004. ISSN 14138123.

NASCENTES, C.C.; ARRUDA, M. A. Z.; MANIASSO, N. Experimentos didáticos em química analítica envolvendo separação de fase e pré-concentração. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, p. 483-489, 2002.

NASCIMENTO FILHO, V.F. Técnicas analíticas nucleares de fluorescência de raios X por dispersão de energia (EDXRF) e por reflexão total (TXRF). Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1999. 32p

OSKARSSON, A. et al. Lead poisoning in cattle - Transfer of lead to milk. **Science of the Total Environment**, v. 111, n. 2-3, p. 83-94, 1992. ISSN 00489697.

POTTER, M. E., A. F. Kaufmann, P. A. Blake, and R. A. Feldman. **Unpasteurized milk. The hazards of a health fetish**. 1984. J. Am. Med. Assoc. (JAMA). 252:2048-2052.

PYTLAKOWSKA, K.; KOZIK, V.; DABIOCH, M. Complex-forming organic ligands in cloud-point extraction of metal ions: A review. **Talanta**, 2013. ISSN 00399140.

QUINA, F. H.; HINZE, W. L. Surfactant-mediated cloud point extractions: An environmentally benign alternative separation approach. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 38, n. 11, p. 4150-4168, 1999. ISSN 08885885.

ROCHA, S.A. N. **Extração em ponto nuvem com derivatização do surfactante: uma alternativa para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em águas naturais por cromatografia gasosa**. 2013. 84 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

SANTOS, L. G. C. Supressão Compton na análise por ativação neutrônica instrumental de produtos agrícolas destinados à alimentação humana. 2004. 86p. **Dissertação (Mestrado em Ciências)** – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

SANZ-MEDEL, A. et al. Organised surfactant assemblies in analytical atomic spectrometry. **Spectroc. Acta Pt. B-Atom. Spectr.** 54: 251-287 p. 1999.

SHARMA, R.P., J.C. STREET, J.L. SHUPE AND D.R. BOURCIER, 1982. Accumulation and depletion of cadmium and lead in tissues and milk of lactating cows fed small amounts of these metals. **J. Dairy Sci**, 65: 972-979.

SILVA, N.; SENANAYAKE, H.; WADUGE, V. Elevated levels of whole blood nickel in a group of Sri Lankan women with endometriosis: a case control study. **BMC Research Notes**, v. 6, p. 13-13, 2013.

SILVA, R. M. C. e; NASCIMENTO FILHO, V. F.; APPOLONI, C. R. FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X POR DISPERSÃO EM ENERGIA. **Lfnatec: Publicação Técnica do Laboratório de Física Nuclear Aplicada**, Londrina, v. 8, n. 1, p.1-19, mar. 2004.

SOUZA, L.; CANTERAS, F.; MOREIRA, S. Analyses of heavy metals in sewage and sludge from treatment plants in the cities of Campinas and Jaguariuna, using synchrotron radiation total reflection X-ray fluorescence. **Radiat. Phys. Chem.**, v. 95, p. 342-345, 2014. ISSN 0969-806X.

SWARUP, R. et al. Blood lead levels in lactating cows reared around polluted localities; Transfer of lead into milk. **Science of the Total Environment**, v. 347, n. 1-3, p. 106-110, 2005. ISSN 00489697.

VIDAL, A. M. C. Microrganismos heterotróficos mesófilos e bactérias do grupo *Bacillus cereus* em leite UAT (Ultra Alta Temperatura) integral. Jaboticabal: **UNESP**, 2001. 65p. (Dissertação MS).

WALSTRA, P.; WOUTERS, J.T.M.; GEURTS, T.J. Dairy Science and Technology. 2.ed. **Boca Raton**: Taylor & Francis Group, 2006, 782 p.

WATANABE, H.; TANAKA, H. A non-ionic surfactant as a new solvent for liquid-liquid extraction of zinc(II) with 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol. **Talanta**, v. 25, n. 10, p. 585-589, 1978. ISSN 00399140.

WOBRAUSCHEK, P.; AIGINGER, H. Total-reflection x-ray fluorescence spectrometric determination of elements in nanogram amounts. **Analytical Chemistry**, v. 47, n. 6, p. 852-855, 1975. ISSN 0003-2700.

YONEDA, Y.; HORIUCHI, T. Optical flats for use in x-ray spectrochemical microanalysis. **Review of Scientific Instruments**, v. 42, n. 7, p. 169-170, 1971. ISSN 00346748.

WHO. World Health Organization (Org.). **EXPOSURE TO LEAD: A MAJOR PUBLIC HEALTH CONCERN**. 2010. Disponível em: <<http://www.who.int/ipcs/features/lead.pdf>>. Acesso em: 07 jan. 2015.

WHO/ICPS. World Health Organization/International Programme on Chemical Safety. Inorganic Lead Environmental Health Criteria 165. **Geneva**, 1995. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc165.htm>. Acesso em: 28/dez/2014