

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Exatas

Departamento de Química

Ednilton Moreira Gama

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE
ANALITOS INORGÂNICOS EM BEBIDAS EMPREGANDO
PROCEDIMENTOS MÍNIMOS DE PREPARO DE AMOSTRAS**

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Clésia Cristina Nascentes

Coorientador: Prof. Dr. Guilherme Dias Rodrigues

Belo Horizonte
2018

UFMG/ICEx/DQ. 1289^a

T. 584^a

Ednilton Moreira Gama

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE
ANALITOS INORGÂNICOS EM BEBIDAS EMPREGANDO
PROCEDIMENTOS MÍNIMOS DE PREPARO DE AMOSTRAS**

Tese apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências – Química.

Belo Horizonte

2018

Ficha Catalográfica

G184d Gama, Ednilton Moreira
2018 Desenvolvimento de métodos para determinação de
T analitos inorgânicos em bebidas empregando
procedimentos mínimos de preparo de amostras
[manuscrito] / Ednilton Moreira Gama. 2018.
[xix], 117 f. : il.

Orientadora: Clésia Cristina Nascentes.
Coorientador: Guilherme Dias Rodrigues.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas
Gerais - Departamento de Química.
Inclui bibliografia.

1. Química analítica - Teses 2. Alimentos - Análise
- Teses 3. Preparação de amostra (Química) - Teses 4.
Bebidas alcoólicas - Teses 5. Espectroscopia de chama
- Teses 6. Fluorescência de raio X - Teses I.
Nascentes, Clésia Cristina, Orientadora II. Rodrigues,
Guilherme Dias, Coorientador III. Título.

CDU 043

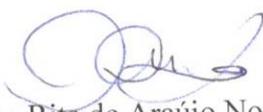
"Desenvolvimento de Métodos para Determinação de Analitos Inorgânicos em Bebidas Empregando Procedimentos Mínimos de Preparo de Amostras"

Ednilton Moreira Gama

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Prof. Clésia Cristina Nascentes - Orientadora
UFMG


Prof. Guilherme Dias Rodrigues - Coorientador
UFMG


Prof. Ana Rita de Araújo Nogueira
EMBRAPA


Prof. Valfredo Azevedo Lemos
UESB


Prof. Leticia Malta Costa
UFMG


Prof. Ricardo Mathias Orlando
UFMG
Belo Horizonte, 20 de julho de 2018.

AGRADECIMENTOS

A conclusão deste trabalho não seria possível sem a colaboração, estímulo e apoio de diversas pessoas. Quero manifestar os meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esta tarefa se tornasse uma realidade.

Primeiramente agradeço a Deus por estar presente em todos os momentos de minha vida e ter permitido a conclusão deste trabalho;

A minha esposa Roberta Pereira Matos pelo amor, compreensão, estímulo e incansável apoio e ajuda;

À minha família que me apoiou e torceu pelo meu sucesso, em especial, à minha mãe Coleta Moreira Gama pelo amor, motivação, orações e confiança em meu potencial;

À professora Dra. Clésia Cristina Nascentes pela orientação, ensinamentos, compreensão e conversas, que muito contribuíram para a realização deste trabalho e para minha formação profissional e pessoal.

Ao professor Dr. Guilherme Dias Rodrigues pela co-orientação e disponibilidade. Ao pessoal do LEAQUA pela amizade e colaboração, em especial à Louise e Mariana.

Aos amigos Davi, Alexandre, Gilvan, Samara, Carlos, Ana e muitos outros.

À Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em especial ao Departamento de Química (DQ), pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Instituto Federal do Norte de Minas, campus Almenara, pela compreensão em organizar meus horários de forma que pudesse viajar para Belo Horizonte, e pela bolsa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, **MUITO OBRIGADO!**

“Todo aquele que está seriamente envolvido na busca da ciência, é convencido de que um espírito é manifestado nas leis do universo, o qual é muitíssimo superior ao do homem.”

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
LISTA DE FIGURAS	xv
LISTA DE TABELAS	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS	xix
INTRODUÇÃO	01
CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	03
1.1. LEITE E SEUS CONSTITUINTES	04
1.2. CÁDMIO: GENERALIDADES E PROPRIEDADES	05
1.3. DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS EM AMOSTRAS DE LEITE	06
1.4. SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO (SAB): CONCEITOS, PROPRIEDADES E APLICAÇÕES	09
1.4.1. CONCEITOS E PROPRIEDADES	09
1.4.2. APLICAÇÃO DO SAB NA EXTRAÇÃO DE ÍONS METÁLICOS	14
1.5. VINHO	16
1.6. CERVEJA	19
1.6.1. DETERMINAÇÃO DOS CONSTITUINTES INORGÂNICOS DA CERVEJA	22
1.7. FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X POR REFLEXÃO TOTAL (TXRF)	23
1.7.1. ANÁLISE QUANTITATIVA EM TXRF	25
1.8. VALIDAÇÃO	27

CAPÍTULO 2- ANÁLISE DE CÁDMIO EM AMOSTRAS DE LEITE BOVINO EMPREGANDO SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO	33
2.1. INTRODUÇÃO	34
2.2. OBJETIVOS	35
2.2.1. OBJETIVO GERAL	35
2.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
2.3. EXPERIMENTAL	36
2.3.1. INSTRUMENTAÇÃO ANALÍTICA	36
2.3.2. REAGENTES E PADRÕES	36
2.3.3. COLETA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE LEITE	37
2.3.4. EFEITO DA QUANTIDADE DE EXTRATOR ADICIONADO	37
2.3.5. EFEITO DO ELETRÓLITO NA EXTRAÇÃO DE Cd (II) NO SAB	38
2.3.6. PROCEDIMENTO DE MONTAGEM DO SAB	39
2.3.7. VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO PARA Cd(II)	40
2.4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	42
2.4.1. OTIMIZAÇÃO DO SAB PARA EXTRAÇÃO DE Cd(II)	42
2.4.2. EFEITO DA QUANTIDADE DE AGENTE EXTRATOR	42
2.4.3. EFEITO DO ELETRÓLITO NA EXTRAÇÃO DE Cd(II) NO SAB	45
2.4.4. INFLUÊNCIA DO COMPRIMENTO DA LINHA DE AMARRAÇÃO	47
2.4.5. EFEITO DO PESO MOLECULAR DO POLÍMERO	48
2.4.6. RAZÃO MÁSSICA	49
2.4.7. FIGURAS DE MÉRITO	50
2.5. CONCLUSÃO	52
	54

CAPÍTULO 3-ANÁLISE MULTIELEMENTAR DE VINHO TINTO USANDO FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X POR REFLEXÃO TOTAL

3.1. INTRODUÇÃO	55
3.2. OBJETIVOS	56
3.2.1. OBJETIVO GERAL	56
3.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	56
3.3. EXPERIMENTAL	57
3.3.1. INSTRUMENTAÇÃO	57
3.3.2. REAGENTES E MATERIAIS	57
3.3.3. COLETA DE PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS	58
3.3.4. OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO	58
3.3.5. VALIDAÇÃO DO MÉTODO	60
3.3.6. ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE VINHO TINTO POR TXRF	61
3.4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	61
3.4.1. A OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO	61
3.4.1.1. AVALIAÇÃO DO PADRÃO INTERNO	61
3.4.1.2. AVALIAÇÃO DO TEMPO DE MEDIÇÃO	62
3.4.1.3. EFEITO DA DILUIÇÃO DA AMOSTRA E DA FORMA DE SECAGEM	64
3.4.1.4. VALIDAÇÃO DO MÉTODO	64
3.4.2. APLICAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO PARA DETERMINAÇÃO MULTIELEMENTAR EM AMOSTRAS DE VINHO TINTO	65
3.5. CONCLUSÃO	69

CAPÍTULO 4-DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE ANÁLISE DIRETA DE CERVEJA UTILIZANDO TXRF	70
4.1. INTRODUÇÃO	71
4.2. OBJETIVOS	72
4.2.1. OBJETIVO GERAL	72
4.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	72
4.3. EXPERIMENTAL	72
4.3.1. INSTRUMENTAÇÃO	72
4.3.2. REAGENTES E MATERIAIS	73
4.3.3. COLETA E PRETRATAMENTO DAS AMOSTRAS	74
4.3.4. OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO	74
4.3.5. VALIDAÇÃO DO MÉTODO	75
4.3.6. ANÁLISE DE AMOSTRAS DE CERVEJA POR TXRF	75
4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
4.4.1. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO	76
4.4.1.1 AVALIAÇÃO DO PADRÃO INTERNO	76
4.4.1.2. AVALIAÇÃO DO TEMPO DE MEDIDA	77
4.4.2. VALIDAÇÃO DO MÉTODO	78
4.4.3. APLICAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO PARA A DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS INORGÂNICOS EM AMOSTRAS DE CERVEJA	81
4.5. CONCLUSÃO	84
CAPÍTULO 5-CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
5.1. CONSIDERAÇÕES FINAIS	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE ANALITOS INORGÂNICOS EM BEBIDAS EMPREGANDO PROCEDIMENTOS MÍNIMOS DE PREPARO DE AMOSTRAS

Resumo

Esse trabalho visa desenvolver métodos de determinação de analitos inorgânicos em alimentos, empregando técnicas que utilizam um mínimo preparo de amostra e são ambientalmente amigáveis. Para isso foi desenvolvido um método utilizando sistema aquoso bifásico (SAB) estudando as variáveis: concentração do agente extrator iodeto (280 mmol kg^{-1}), natureza do polímero (PEO1500), tipo de eletrólito (Na_2SO_4) formador do sistema sobre a porcentagem de extração (%E) de Cd(II) ($99,8\% \pm 0,4$), comprimento da linha de amarração ($32,28\%(m/m)$) e razão entre as massas das fases superior e inferior (1,0) a partir de leite bovino. O método validado foi aplicado na determinação de Cd(II) em amostras de leite. Outro método desenvolvido quantificou os constituintes inorgânicos do vinho tinto utilizando fluorescência de raios-X por reflexão total (TXRF) após a diluição das amostras de vinho e adicionando solução de Ga. Os elementos avaliados foram (mg L^{-1}) P: (27,5-202); S (46-177); Cl (3-182); K (575-1229); Ca (39-119); Ti (0,1-0,3); Mn (0,1-0,3); V (<LD-0,07); Fe (1-3,8); Ni (<LD-0,3); Cu (0,03-0,9); Zn (0,18-1,57); As (0,004-0,03); Br (0,14-13,4); Rb (0,49-4,03); Sr (0,52-2,19); Ba (<LD-0,48) e Pb (<LD-0,01). Também foi desenvolvido outro método de análise direta para quantificação 15 analitos em cerveja e detecção por TXRF. Esse procedimento de análise direta foi comparado com o de digestão ácida para avaliar o efeito de matriz. A exatidão e a precisão foram avaliadas utilizando material de referência certificado. Foram analisadas 30 amostras de cerveja coletadas em várias regiões do Brasil. Os elementos avaliados foram (mg L^{-1}): P: (37,40-140,85); S (10,32-50,73); Cl (82,74-281,7); K (183,8-418,5); Ca (9,82-96,0); Mn (0,06 a 1,42); Fe (0,07-1,57); Ni (<LD-1,13); Cu (<LD-0,32); Zn (0,02-1,98); As (<LD-0,10); Br (0,01-2,04); Rb (<LD-0,52); Sr (<LD-0,41) e Pb (<LD-0,18). Os métodos desenvolvidos são simples, rápidos, ambientalmente amigáveis e podem ser aplicados à análise de rotina.

Palavras Chave: Preparo de Amostra. Alimentos. FAAS. TXRF.

DEVELOPMENT OF METHODS FOR DETERMINATION INORGANIC ANALYZES IN DRINKS EMPLOYING MINIMUM SAMPLE PREPARATION PROCEDURES

ABSTRACT

This work seeks to develop methods of inorganic analytes determination in foods, employing techniques that use a minimum sample preparation and that are environmentally friendly. For this, a method was developed using two-phase aqueous system (SAB), studying the following variables: concentration of extractor agent iodide (280 mmol kg^{-1}), polymer type (PEO1500), type of electrolyte (Na_2SO_4) forming the percentage system in (%) of Cd (II) ($99.8\% \pm 0.4$), mooring line length ($32.28\% \text{ (m / m)}$) and ratio between upper and lower phase masses (1,0) from bovine milk. The validated method was applied in the Cd(II) in milk samples determination. Another method developed quantified the inorganic constituents of red wine using XRF fluorescence by total reflection (TXRF) after the dilution of the wine samples and adding Ga solution. The evaluated elements were (mg L^{-1}) P: (27.5-202); S (46-177); Cl (3-182); K (575-1229); Ca (39-119); Ti (0.1-0.3); Mn (0.1-0.3); V (<LD-0.07); Fe (1-3.8); Ni (<LD-0.3); Cu (0.03-0.9); Zn (0.18-1.57); As (0.004-0.03); Br (0.14-13.4); Rb (0.49-4.03); Sr (0.52-2.19); Ba (<LD-0.48) and Pb (<LD-0.01). Another direct analysis method for the quantification of 15 analytes in beer and detection by TXRF was also developed. This procedure of direct analysis was compared to acid digestion to evaluate the matrix effect. Accuracy and precision were assessed using certified reference material. It was analyzed thirty beer samples collected in several regions in Brazil. The evaluated elements were (mg L^{-1}): P: (37.40-140.85); S (10.32-50.73); Cl (82.74-281.7); K (183.8-418.5); Ca (9.82-96.0); Mn (0.06 to 1.42); Fe (0.07-1.57); Ni (<LD-1.13); Cu (<LD-0.32); Zn (0.02-1.98); As (<LD-0.10); Br (0.01-2.04); Rb (<LD-0.52); Sr (<LD-0.41) and Pb (<LD-0.18). The methods developed are simple, fast, environmentally friendly and they can be applied to routine analysis.

Keywords: Sample Preparation. Foods. FAAS. TXRF.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Composições para um ponto de mistura do sistema aquoso bifásico poli(óxido de etileno), PEO1500 g mol ⁻¹ + sulfato de sódio + água , à 25 °C	11
Figura 1.2	Diagrama de fase expresso em coordenadas retangulares de um SAB constituído por polímero e eletrólito.	12
Figura 1.3	Diagrama de fase explicitando a variação do volume das fases em função das diferentes composições globais do SAB..	13
Figura 1.4	Processo de produção da cerveja	21
Figura 1.5	Arranjo simplificado usado para (a) XRF convencional e para (b) TXRF.	24
Figura 1.6	Gráfico dos resíduos mostrando (a) desvios da linearidade, (b) amostras atípicas, (c) heterocedasticidade, (d) erros correlacionados e (e)resíduos com homocedasticidade e normalmente distribuídos.	30
Figura 2.1	Efeito da concentração de extrator iodeto na porcentagem de extração (%E) de Cd(II) utilizando PEO1500 + Na ₂ SO ₄ + H ₂ O, CLA 32,28%(m/m)	43
Figura 2.2	Efeito do eletrólito na extração de íons Cd(II) utilizando PEG1500 + Na ₂ SO ₄ + H ₂ O (▲),PEG1500 + Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ + H ₂ O (■) e PEG1500 + Na ₂ C ₄ H ₄ O ₆ + H ₂ O (○), T = 25°C.	46
Figura 2.3	Efeito do comprimento da linha de amarração (CLA) na %E de Cd(II) utilizando o sistema PEO 1500+ Na ₂ SO ₄ + H ₂ O (CLA = 32,28%) (Δ),PEO 1500+ Na ₂ SO ₄ + H ₂ O (CLA = 35,94%) (○),PEO 1500+ Na ₂ SO ₄ + H ₂ O (CLA = 40,10%) (■) e PEO 1500+ Na ₂ SO ₄ + H ₂ O (CLA = 32,28%) (▼),T = 25°C.	47
Figura 2.4	Efeito da natureza do polímero e da [I ⁻] utilizando os sistemas formados por PEO400 + Na ₂ SO ₄ + H ₂ O (CLA 45,69%(m/m)) (■), PEO1500 + Na ₂ SO ₄ + H ₂ O (CLA 46,97%(m/m)) (○) e PEO6000 + Na ₂ SO ₄ + H ₂ O (CLA 45,05%(m/m)) (▲).	49
Figura 2.5.	Efeito da razão mássica entre FS e a FI na %E de Cd(II)	50

utilizando o sistema formado por PEO1500+Na₂SO₄+H₂O
CLA = 32,28%(m/m) para as M_{FS}/M_{FI} = 0,75 (○); 1,0 (■) e
0,5 (▲).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	Composição aproximada (% massa) de leite humano, bovino, de cabra, de ovelha e de búfalo.	04
Tabela 1.2	Os maiores produtores mundiais de leite bovino no período de 2011 a 2016, mil toneladas.	09
Tabela 1.3	Alguns trabalhos encontrados na literatura que abordam a extração de Cd(II) por SAB, usando iodeto como agente extrator.	16
Tabela 1.4	Métodos de Análise dos Analitos Inorgânicos de Vinho.	19
Tabela 1.5	Métodos de Análise dos Analitos Inorgânicos de Vinho	23
Tabela 1.6	Aplicação da TXRF na análise de amostras de alimentos e água.	27
Tabela 2.1	Composição em % (m/m) de PEO 1500 (m_p) + sal (m_s) + Água SAB (298,0 K) a diferentes comprimentos da linha de amarração (CLA).	39
Tabela 2.2	Figuras de mérito.	51
Tabela 2.3	Concentração de cádmio nas amostras de leite analisadas	52
Tabela 3.1	Resultados experimentais para avaliação de padrões internos (Ga, Y e Ge) nas amostras de vinho tinto fortificadas com Pb e As, 200 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, ($n = 3$). Tempo de aquisição do sinal = 500 s.	62
Tabela 3.2	Efeito do tempo de medida nos menores limites de detecção (LLD) para os elementos P, S, Cl, K, Ca, Ti, V, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Br, Rb, Sr, Ba e Pb nas amostras de vinho.	63
Tabela 3.3	Resultados (mg L^{-1}) dos elementos (Cu, Mn, Br, Sr, V, Fe, Ni, Ba, Zn, As e Pb) utilizados para avaliar a exatidão e precisão do método proposto usando o procedimento de adição padrão.	65
Tabela 3.4	Faixa de concentração (mg L^{-1}) dos elementos quantificados em 70 amostras de vinho tinto (valores mínimos e máximos, média e desvio padrão (DP))	66

Tabela 4.1	Resultados experimentais para avaliação do padrão interno (Ga , Y e Ge) em amostras de cerveja fortificadas no nível de 200 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Pb e As, respectivamente (n = 3) com tempo de medição de 500 s.	76
Tabela 4.2	Efeito do tempo de medição no menor limite de detecção (LLD) para P, S, Cl, K, Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Br, Rb, Sr e Pb na amostra de cerveja.	78
Tabela 4.3	Desempenho analítico do método usando TXRF.	79
Tabela 4.4	Avaliação da precisão e da exatidão do método proposto	80
Tabela 4.5	Concentração (mg L^{-1}) dos micro e macroelementos e oligoelementos em 30 amostras de cervejas (valores mínimos e máximos, média e desvio padrão (DP)).	83

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

AAS	<i>Atomic Absorption Spectrometry</i> (Espectrometria de Absorção Atômica)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
CE	Comunidade Européia
CODEX STAN	O Codex Alimentarius (expressão em latim que significa "código alimentar", ou "livro sobre alimentos") é uma coletânea de padrões reconhecidos internacionalmente. Esses textos são desenvolvidos e mantidos pela Codex Alimentarius Commission , uma comissão estabelecida em 1963 pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) da Organização das Nações Unidas e a Organização Mundial da Saúde (OMS).
CFI	Composição da Fase Inferior
CLA	Comprimento da Linha de Amarração
CFS	Composição da Fase Superior
CV	Coefficiente de Variância
DPR	Desvio Padrão Relativo
ET-AAS	<i>Electrothermal atomic absorption spectrometry</i> (Espectrometria de Absorção Atômica Eletrotérmica)
EDXRF	<i>Energy Dispersive X-ray Fluorescence</i> (Fluorescência de Raios-X por Energia Dispersiva)
EU	União Européia
EUA	Estados Unidos da América
%E	Porcentagem de Extração
FAAS	<i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i> (Espectrometria de Absorção Atômica com Chama)
FI	Fase Inferior

FS	Fase Superior
GF AAS	<i>Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i> (Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite)
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICP OES	Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado)
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado)
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia
IS	Internal Standard (Padrão Interno)
LA	Linha de Amarração
LB	Linha Binodal
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
M_{FI}	Massa da Fase Inferior
M_{FS}	Massa da Fase Superior
MMQO	Método dos Mínimos Quadrados Ordinários
MRC	Material de Referência Certificado
MS	Ministério da Saúde
NIST SRM	<i>Standard Reference Material NIST</i>
OIV	Organização Internacional da Vinha e do Vinho
P_c	Ponto Crítico
PEO	Polietileno Glicol
PNCRC/Animal	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal

PNMQL	Plano Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite
PTFE	<i>Polytetrafluorethylene</i> (Politetrafluoretileno)
SAB	Sistema Aquoso Bifásico
SDD	Silicon Drift Detector (Detector Derivado de Silício)
Sindicerv	Sindicato Nacional da Indústria da Cerveja
SSD	Semiconductor Detector (Detectores de Semicondutores)
TS-FF-AAS	Thermospray Flame Furnace Atomic Absorption Spectrometry (Espectrometria de Absorção Atômica com Forno Tubular na Chama e Aerossol Térmico)
TXRF	Total Reflection X-ray Fluorescence (Fluorescência de Raios-X com Reflexão Total)

INTRODUÇÃO

Leite, vinho e cerveja são bebidas amplamente consumidas em todo o mundo. Essas bebidas podem ser contaminadas por micro e macro-elementos através de fontes naturais e antrópicas.

O leite está presente na dieta humana, principalmente por conter proteínas e minerais essenciais para promover o crescimento e manutenção da vida. A principal rota de contaminação por elementos traço tóxicos no leite pode ser através de insumos agrícolas contaminados (Marçal, et al., 1988). O cádmio se destaca entre os elementos de grande interesse ambiental, por sua alta toxicidade, bioacumulação e poder carcinogênico, sendo o limite máximo estabelecido em leite de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ (ANVISA, 2013). A determinação de analitos em baixas concentrações em matrizes complexas é difícil e novas estratégias analíticas são desejáveis. Neste contexto, a utilização de sistema aquoso bifásico (SAB) como técnica de extração é uma boa alternativa, por ser uma técnica limpa (reagentes atóxicos), rápida, simples e de baixo custo.

O vinho é uma bebida amplamente consumida no mundo há séculos, com grande valor comercial e importância social. A análise de certos analitos nos vinhos é de especial interesse devido à sua toxicidade em caso de ingestão excessiva. Associado a isso também está o efeito que alguns elementos (ferro, cobre, manganês, etc) têm nas propriedades organolépticas do vinho, influenciando no processo de produção dessa bebida (Goldberg & Bromberg, 1996). Neste contexto, técnicas analíticas multielementares são interessantes, pois permitem avaliar o perfil dos constituintes inorgânicos presentes em amostras de diferentes origens. Dessa forma, esse trabalho objetivou desenvolver um método direto para a quantificação de constituintes inorgânicos em diferentes marcas de vinho tinto utilizando a fluorescência de raios X por reflexão total (TXRF), uma técnica multielementar ainda pouco explorada. Para isso foram utilizados um grande número de amostras de vinhos tintos (setenta) de vários países e de diferentes tipos de uva (ex. Merlot, Cabernet Sauvignon, Malbec, dentre outras).

No processo de produção da cerveja podem ocorrer possíveis contaminações por elementos inorgânicos que podem acarretar sérios problemas de saúde (Briggs, 2004; Pohl, 2008). Assim é importante avaliar esses constituintes inorgânicos na cerveja que podem ser originados de fontes naturais (solo, água, cereais, lúpulo e levedura), bem como da contaminação ambiental devido aos fertilizantes, pesticidas, processamento industrial e os recipientes (Van Loon et al., 1993). Diante disso, foi desenvolvido um método rápido e preciso para a determinação simultânea de P, S, Cl, K, Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Br, Rb, Sr e Pb em amostras de cerveja pilsen aplicando a técnica TXRF.

A maioria dos métodos para determinação dos micro e macroelementos em alimentos (leite, vinho e cerveja) encontrados na literatura utiliza preparo de amostra envolvendo digestão ácida. Assim, esse trabalho pretende desenvolver métodos analíticos para determinação de analitos inorgânicos em alimentos empregando técnicas de preparo mínimo de amostras e ambientalmente amigáveis.

Desta forma, essa tese foi dividida em 5 capítulos, sendo o primeiro capítulo destinado a fundamentação teórica sobre os aspectos mais importantes relacionados aos temas abordados.

No Capítulo 2 é apresentado o desenvolvimento de um método para determinação de cádmio em amostras de leite bovino empregando sistema aquoso bifásico e a espectrometria de absorção atômica com chama como técnica de detecção.

No Capítulo 3 é descrito o processo de análise multielementar de vinho tinto usando TXRF. Nesta etapa foram analisadas um grande número de amostras de vinhos tintos de vários países e de diferentes tipos de uva.

No Capítulo 4 é apresentado o desenvolvimento de método de análise direta de cerveja utilizando TXRF, sendo avaliada a necessidade de se fazer a digestão das amostras de cerveja.

Por fim, no Capítulo 5 são apresentadas as considerações finais, com as contribuições desta tese e as perspectivas de trabalhos futuros à pesquisa apresentada.

Capítulo 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Leite e seus constituintes

O leite é um alimento proveniente da secreção mamária de alguns animais. O leite bovino é amplamente consumido por seres humanos, principalmente crianças (Silver, 1975). Ele apresenta uma grande quantidade de proteínas, gorduras, vitaminas e sais minerais, sendo considerado um dos gêneros alimentícios mais completos com relação ao teor nutritivo (**Tabela 1.1**).

Tabela 1.1. Composição aproximada (% em massa) de leite humano, bovino, de cabra, de ovelha e de búfalo.

Componente	Humano	Bovino	Cabra	Ovelha	Búfalo
Proteína	2,0	6,2	6,0	9,8	7,7
Gordura	3,8	3,7	4,5	7,4	7,9
Lactose	7,0	4,6	4,1	4,8	6,9
Minerais	0,2	0,7	0,8	1,0	0,20
Água	87,5	87,2	87,0	80,7	83,6

Fonte: Pandey & Ghodke (2007) – Adaptado.

A presença destas substâncias nos alimentos é um indicador de parâmetros qualitativos, tais como condições de processamento, poluição ambiental, saneamento e manejo, e pode afetar as propriedades químicas e funcionais do leite. A presença de elementos como alumínio (Al), chumbo (Pb), cádmio (Cd) e arsênio (As) pode promover a contaminação dos alimentos através das ferramentas e máquinas usadas na produção de laticínios. Al, Pb e Cd podem aparecer ligados a lipídeos juntamente com caseína, e um aumento na acidez permite liberação deles da coalhada. Esse processo é chamado de desmineralização das micelas de caseína (Coni et al., 1996).

Como os metais traço, alguns minerais são essenciais para manter os sistemas metabólicos do corpo humano. No entanto, em níveis mais altos, eles podem levar ao envenenamento. Como exemplo pode ser citado o manganês

(Mn) que é um elemento essencial para os seres humanos porque desempenha um papel importante no controle do estresse oxidativo, além de ser um co-fator para a atividade da absorção de biotina (vitamina H), tiamina (vitamina B1) e vitamina C e para o transporte de cobre. No entanto, quantidades excessivas desse elemento podem causar sérios danos à saúde (Tripathi et al., 1999; Araújo et al., 2007; Lemos & David, 2010). Alguns elementos tóxicos contaminam animais e organismos humanos através das plantas. As glândulas mamárias são a parte mais fisiologicamente ativa de vacas leiteiras e, portanto, a entrada e saída de elementos tóxicos nestes organismos são claramente refletidas no leite (Ataro et al., 2008; Maas et al., 2011). As crianças são mais sensíveis a contaminantes que os adultos. Como resultado, a absorção normal de pequenas quantidades de certos elementos, como o chumbo, pode causar efeitos graves sobre a saúde das crianças em crescimento. Dentre esses efeitos pode-se citar retardo mental de desenvolvimento (por exemplo, leitura e dificuldades de aprendizagem), deficiências na concentração, efeitos adversos sobre a função renal, química do sangue e o sistema cardiovascular, bem como a deficiência auditiva (Ataro et al., 2008 ;. Salma et al., 2000). Portanto, é importante monitorar os elementos traço em leite, que é uma importante fonte de nutrição na infância, consumida com cereais de pequeno-almoço e, como iogurte ou queijo. A legislação brasileira estabelece valores máximos de 0,05, 0,05 e 0,02 mg L⁻¹ para As, Cd e Pb respectivamente, em amostras de leite (ANVISA, 2013).

1.2. Cádmio: generalidades, propriedades

O Cd(II) é considerado um elemento químico cumulativo de alta toxicidade, pois pode causar diversos problemas de saúde, tais como esterilidade, lesões nos rins, nos testículos, osteoporose, lesões no sistema nervoso central, anemia e inibição de crescimento em seres humanos e animais (Andrigheto et al., 1990). Esse metal causa alterações renais em pacientes humanos induzindo osteomalácia pela atrofia no túbulo proximal, influenciando na reabsorção de fósforo (Shirley, 1985).

O aparecimento de metais tóxicos no leite, inclusive cádmio, pode ocorrer mediante rações e pastagens contaminadas. Isso também pode ocorrer através do tratamento dos animais com pesticidas para combater ectoparasitas

e endoparasitas, quando aplicados sem seguir as normas preconizadas pelas boas práticas agropecuárias (Midio & Martins, 2000). O gado pode se contaminar com elementos traço tóxicos através da alimentação ao ingerir rações e suplementos minerais de baixa qualidade. Se esses elementos forem excretados no leite, poderão ter o homem como receptor final da contaminação na cadeia alimentar (Marçal et al., 1988). Por isso, é importante quantificar os elementos Cd(II) em amostras de leite, garantindo a boa qualidade do alimento e contribuindo com melhoria da saúde da população consumidora.

Gonçalves e colaboradores (2008) analisaram amostras de leite no estado de Goiás e encontraram $0,0482 \text{ mg kg}^{-1}$ de Cd(II). Enb et al., (2009) analisaram algumas amostras de leite comercializadas no Egito e encontraram $0,054 \text{ mg kg}^{-1}$ de cádmio. Trabalho semelhante foi realizado na Índia por Abdulkhaliq e colaboradores (2012), que encontraram $0,054 \text{ mg kg}^{-1}$ de cádmio em amostras de leite.

1.3. Determinação de Elementos em Amostras de Leite

A quantificação de Cd(II) em amostras de leite tem sido rotineiramente realizada por diversas técnicas espectroscópicas. Por exemplo, Pilarezyk et al., (2013), utilizaram a espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) para determinar os elementos Cd(II), Pb(II), Ca(II), Mg(II), P, Cu(II), Fe(III), Mn(II), Se e Zn(II) em amostras de leite. Para isso foram mineralizadas 50 mL de amostras de leite em um sistema de micro-ondas Anton Parr antes da quantificação. A quantidade de Pb(II) encontrada foi de $0,0364 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, valor acima do estabelecido pela legislação internacional. Ayar et al., (2009) realizou uma decomposição ácida empregando sistema de micro-ondas na determinação de Cd(II) e outros elementos em leite integral e produtos lácteos por ICP OES.

A técnica de ICP-MS também tem sido utilizada na determinação multielementar em amostras de leite, principalmente depois da etapa de digestão com agentes oxidantes (Frazzoli & Bocca, 2008; Ataro et al., 2008; Santos et al., 2009). Frazzoli & Bocca (2008), determinaram As, Cd(II) e Pb(II) em leite bovino e fórmulas infantis empregando ICP-MS após digestão com HNO_3 e H_2O_2 em forno micro-ondas com sistema fechado.

Em outro trabalho, trinta e duas amostras de leite produzidas em Minas Gerais foram analisadas por ICP-MS após liofilização e decomposição ácida assistida por radiação micro-ondas. Os macro e micronutrientes foram determinados e as concentrações destes constituintes nas amostras foram avaliadas (Santos et al., 2009). As características mais atrativas dessa técnica são a capacidade multielementar e os baixos limites de detecção (LD), melhores que na técnica ICP OES. A maioria dos limites de detecção chega a 1 a 10 ng L⁻¹ em soluções, sendo possível quantificar uma gama de elementos que possuem limites de detecção (LD) insuficientes em ICP OES. Porém, esta característica só é válida se o volume de sólidos totais dissolvidos for menor que 0,2% (Wolf, 2005; Tyler, 1994).

A espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS) é outra técnica analítica muito utilizada na quantificação de metais em baixas concentrações em matrizes de importância biológica, tais como o leite. Ela é utilizada não só por causa da eficiência e sensibilidade (Vandecasteele, 1993), mas também pela possibilidade de remoção da matriz na etapa de pirólise, através da utilização de modificadores químicos (Volynskii, 2000; 2003), que possibilitam a introdução da amostra com ínfima preparação. Quinaia & Nóbrega (2000) desenvolveram um método para determinação direta de Cr em leite usando GF AAS com correção de fundo por efeito Zeeman e uma mistura de aminas como diluente. Os valores encontrados variaram de 0,98 a 18,1 ng g⁻¹ para amostras de leite integral em pó. Em outro trabalho, Al-Awadi & Srikumar (2000) realizaram uma digestão ácida misturando ácido nítrico e perclórico no preparo de 13 amostras de leite humano e encontraram uma média de 4,0 µg L⁻¹ de Mn(II) pela técnica de GF AAS.

A espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS) também pode ser utilizada na determinação de elementos traço em diversas matrizes. Silvestre e colaboradores (2000) determinaram Cu(II), Fe(III) e Zn(II) por FAAS em leite humano após mineralização das amostras por micro-ondas. As características analíticas desse método foram satisfatórias e as concentração de Zn(II) encontradas foram de 8,60 ± 1,82 mg L⁻¹ em colostro e 0,89 ± 1,97 mg L⁻¹ em leite maturado.

Em se tratando de análises de rotina, é interessante a proposição de métodos de análise direta ou com o mínimo de preparo das amostras. Estima-

se que essa etapa requer, em média, mais de 60% do tempo total dedicado à análise e seja responsável por 20 a 30% dos erros analíticos. (Matusiewicz, 2003). Alguns trabalhos da literatura propõem a determinação direta de micronutrientes em leite por FAAS ou técnicas similares, como pode ser verificado observando a Tabela 1.2. No trabalho de Bermejo et al., (1997) foi utilizado diferentes tipos de nebulizadores na determinação direta de Fe(II) e Zn(II) em amostras de leite por FAAS. O método apresentou características analíticas adequadas e foram obtidas concentrações de Zn(II) entre 2,73 a 7,99 mg L⁻¹ para leite integral, 2,65 a 4,99 mg L⁻¹ para desnatado e 0,36 a 0,82 mg L⁻¹ para soro. No método otimizado por Nascentes e colaboradores (2005), Zn(II) e Cu(II) foram determinados diretamente em amostras de sucos de frutas e leite bovino por espectrometria de absorção atômica com forno na chama e aerossol térmico (TS-FF-AAS). O método apresentou características analíticas aceitáveis para o material certificado e foi encontrado concentrações de Zn de $3,69 \pm 0,03$ mg L⁻¹ e $3,92 \pm 0,22$ mg L⁻¹ nas duas amostras de leite analisadas.

Em comparação com outras técnicas analíticas, a FAAS se destaca por apresentar menor custo, facilidade operacional, elevada frequência analítica e boa seletividade (Pereira & Arruda, 2003). No entanto, a determinação direta de elementos traço, principalmente cádmio, em amostras de leite é muitas vezes difícil, não só devido à baixa concentração desses analitos, mas também por causa dos efeitos da matriz. Para resolver este problema, recorre-se aos procedimentos de separação e pré-concentração, visando a melhoria da sensibilidade e redução da interferência da matriz da amostra (Xiang et al., 2012; Sadeghi & Sheikhzadeh, 2009).

Tabela 1.2. Métodos de análise de cádmio em amostras de leite.

Elemento/ Amostra	Preparo da amostra	Técnica	LD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recuperação (%)	Referência
Cd/ Leite bovino fluido	Digestão ácida em placa de aquecimento.	FAAS	2	98	Malhat et al., 2012
	Digestão ácida por micro- ondas.	GF AAS	0,018	—	Licata et al., 2004
	Digestão $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ por 24 h.	GF AAS	0,01	100	Najarnezhad & Akbarabadi, 2013
	Digestão ácida por micro- ondas.	ICP OES	—	—	El Sayed et al., 2011
	Digestão ácida por micro- ondas.	ICP OES	0,004	95	D'ilio et al., 2008
	Digestão ácida por micro- ondas.	ICP-MS	0,2	82,9	Gonzalez- Montana et al., 2012
	Digestão ácida por micro- ondas.	ICP-MS	0,006	98,5	Bilandzic et al., 2011

1.4. Sistema Aquoso Bifásico: conceitos, propriedades e aplicações

1.4.1. Conceitos e Propriedades

O desenvolvimento de métodos de extração, separação e pré-concentração de íons metálicos é fundamental e desperta muito interesse em inúmeras áreas de importância tecnológica e acadêmica. Um exemplo disso é a necessidade de se utilizar métodos de pré-concentração ambientalmente corretos com o objetivo de melhorar a sensibilidade de técnicas instrumentais. Nesse contexto surgem os sistemas aquosos bifásicos (SAB) que têm como componente majoritário a água. Os demais componentes não são tóxicos nem inflamáveis, e em alguns casos, são biodegradáveis (Da Silva et al., 2006).

O SAB foi descoberto em 1896 quando Beijerinck percebeu que ao misturar uma solução aquosa de gelatina com ágar ou ágar e amido ocorreu a formação de um sistema com aspecto turvo que deixado em repouso, por

algum tempo, formava duas fases (Da Silva et al., 2006; Farajzadeh et al., 2009). Porém, só em 1984 com os trabalhos de Zvarova e colaboradores que esse sistema foi utilizado na partição de íons metálicos. Zvarova *et al.* (1984) estudou os metais radionuclídeos ^{22}Na , ^{42}K , ^{65}Zn , ^{60}Co , ^{115}Cd , ^{64}Cu , ^{144}Ce , ^{177}Lu , ^{51}Cr , $^{152-155}\text{Eu}$, ^{114}In , ^{95}Zr , ^{82}Br (Rodrigues, 2012).

Na década de 1990, Rogers et al. (1996) , demonstraram a influência de alguns dos parâmetros do sistema no particionamento de íons metálicos e relataram que os SAB eram limitados ao uso de extratores hidrossolúveis, tais como os halogenetos, tiocianatos, arsenazo III, alizarina e outros. Mas em 2008 Rodrigues e colaboradores utilizaram copolímeros tribloco, mostrando, pela primeira vez, a possibilidade de se utilizar um complexante pouco solúvel em água. Isso possibilitou uma expansão da aplicação do SAB na extração de íons metálicos (Rodrigues, 2008; Lemos et al., 2013). Atualmente, ainda são poucos os trabalhos encontrados na literatura acerca da aplicação dos SAB à partição de metais, quando comparados com aqueles aplicados à partição de biomoléculas (Zaslavsky, 1995).

Os SAB são formados sob condições termodinâmicas específicas (temperatura, pressão e concentração) (Martins et al., 2008), a partir da mistura entre soluções aquosas de dois polímeros quimicamente diferentes (Zaslavsky, 1995), ou um polímero e um sal inorgânico (Martins et al., 2008) ou ainda a partir de dois tipos de eletrólitos fisicamente incompatíveis (Bridges et al., 2006).

Porém, esse conceito de SAB exige a fixação de determinadas condições termodinâmicas, tais como faixa específica de temperatura, pressão e composição dos constituintes. A etapa de separação de fases resulta, na maioria dos casos, em um sistema heterogêneo composto por duas fases imiscíveis, com uma fase superior (FS), rica em polímero, e uma fase inferior (FI), rica em sal, sendo a água o componente majoritário. A **Figura 1.1** ilustra um SAB formado por PEO 1500, sulfato de sódio e água (Da Silva et al., 2006; Rodrigues et al., 2008).

Há várias vantagens na utilização do SAB como metodologia de separação, tais como: a natureza bifásica oferece várias vantagens na utilização dos SAB como técnica de separação, como: (i) ambiente adequado para preservação da atividade biológica de solutos (De Oliveira et al., 2007;

Haraguchi et al., 2004), devido ao alto teor de água, que simula ambientes celulares; (ii) baixa tensão interfacial, o que beneficia o processo de difusão de compostos através da interface (Albertsson, 1986); (iii) possibilidade de aplicação em larga escala (Kula et al., 1981) e (iv) capacidade de extrair tanto espécies carregadas quanto neutras para a FS, ao passo que na extração líquido-líquido tradicional (ELT) apenas espécies neutras são extraídas eficientemente para a fase polimérica (Rodrigues, 2012).

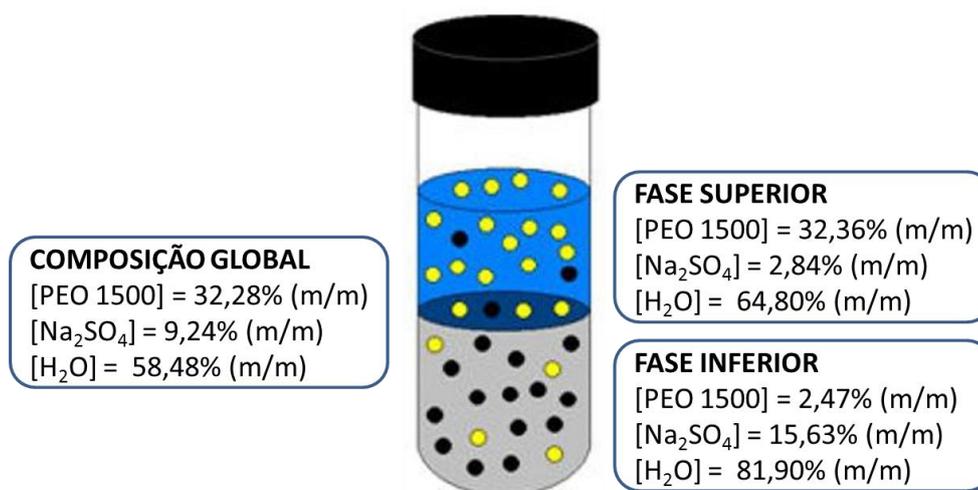


Figura 1.1. Composições para um ponto de mistura do sistema aquoso bifásico poli(óxido de etileno), PEO1500 g mol⁻¹ + sulfato de sódio + água, à 25 °C (RODRIGUES, 2012 - Adaptada).

Geralmente é utilizado um diagrama de fase retangular (**Figura 1.2**) para representar a composição química das duas fases do SAB que se encontra em equilíbrio termodinâmico. Essa representação gráfica é de grande importância para os estudos de partição, pois é utilizada como ferramenta básica para um processo de extração. Os dados de equilíbrio apresentados nesses diagramas estão relacionados à variação da energia livre de Gibbs do sistema, e auxiliam na compreensão dos fatores que governam a partição de um analito qualquer nos SAB (Da Silva et al., 2006).

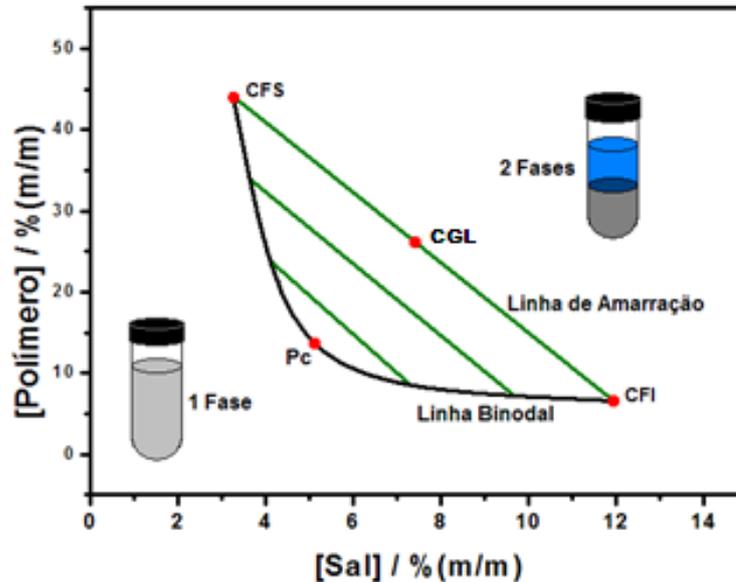


Figura 1.2 Diagrama de fase expresso em coordenadas retangulares de um SAB constituído por polímero e eletrólito (Rodrigues, 2012).

A construção desses diagramas permite obter informações fundamentais para a compreensão das características do sistema com uma ou duas fases, a composição da fase superior (CFS) e composição da fase inferior (CFI). A linha binodal (LB) é a fronteira que delimita as composições de equilíbrio nas quais o sistema se apresenta com uma ou duas fases, sendo pontos de mistura acima da linha binodal geram sistemas bifásicos e pontos de mistura abaixo desta linha geram sistemas monofásicos. A posição da LB no diagrama pode variar com a hidrofiliicidade/hidrofobicidade e a massa molar média do polímero, natureza do eletrólito, temperatura, pressão e pH do meio (Da Silva et al., 2005). Existem diferentes métodos para a obtenção da linha binodal, entretanto o mais utilizado envolve titulação turbidimétrica para determinação da linha pseudo-binodal (o termo “pseudo” se deve ao fato de que esta linha é obtida fora do equilíbrio termodinâmico) e posterior análise das composições das fases (Zaslavsky, 1995; Da Silva et al., 2006).

Essas linhas de amarração, apresentadas na **Figura 1.2**, são retas que unem os pontos no diagrama que representam a composição das duas fases em equilíbrio termodinâmico. Todas as propriedades termodinâmicas intensivas (índice de refração, densidade, condutividade, composição, absortividade molar, etc.) de cada fase são constantes, ao longo de uma mesma linha de

amarração, independente da composição global desse sistema (Da Silva et al., 2006; Rodrigues, 2012).

Por outro lado as propriedades termodinâmicas extensivas (volume, massa, capacidade calorífica, etc.) variam ao longo de uma mesma linha de amarração. Isso pode ser exemplificado observando-se a **Figura 1.3**, onde os pontos de composição global A, B e C terão uma mesma composição de fase superior identificada pelo ponto CFS, e uma mesma composição de fase inferior, dada por CFI. Deste modo, à medida que se desloca em cima de uma linha de amarração, em direção a parte inferior do diagrama, por exemplo, obtêm-se composições globais que formarão SAB com maior volume de fase inferior. Em contrapartida, quando se desloca em direção a parte superior do diagrama, ocorre o inverso, obtêm-se sistemas com maior volume de fase superior (Rodrigues, 2012).

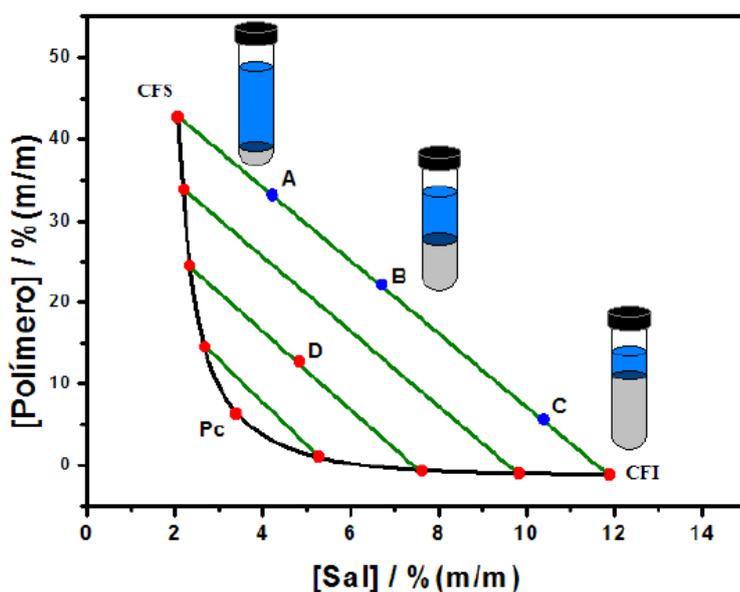


Figura 1.3. Diagrama de fase explicitando a variação do volume das fases em função das diferentes composições globais do SAB (Rodrigues, 2012).

O ponto D (**Figura 1.3**) representa uma composição global que pertence a uma LA com comprimento menor que a linha de amarração que contém o ponto B, isto significa que a diferença entre as propriedades termodinâmicas

das fases do sistema com composição global D são menores do que aquelas apresentadas entre as fases dos sistemas com composições globais A, B ou C. A diminuição sucessiva nos comprimentos das linhas de amarração (CLA) leva ao ponto crítico (Pc). À medida que as composições das duas fases do sistema aproximam deste ponto, a diferença entre as propriedades termodinâmicas dessas fases diminuem até que, teoricamente, tornam-se iguais no Pc (Rodrigues, 2012).

O comprimento da linha de amarração é um importante parâmetro termodinâmico utilizado para medir a diferença entre as propriedades intensivas das fases em equilíbrio. Este parâmetro é calculado a partir dos valores de composição dos solutos de cada fase, de acordo com a **Equação 1.3.1**:

$$CLA = [(C_P^S - C_P^I)^2 + (C_S^S - C_S^I)^2]^{1/2} \quad (1.3.1)$$

onde C_P^S e C_P^I são as concentrações de polímero % (m/m) e C_S^S e C_S^I são as concentrações do sal % (m/m) nas fases superior e inferior, respectivamente. A diferença entre as propriedades termodinâmicas intensivas é diretamente proporcional ao valor do CLA. Isso significa que quanto maior a diferença entre as propriedades maior será a eficiência na extração e/ou partição do analito de interesse, desde que o mesmo tenha afinidade por uma das fases (Da Silva, 2006). Em contra partida, a diminuição do CLA faz com que a composição das duas fases se aproximem do ponto crítico (Pc), onde a diferença entre as propriedades termodinâmicas dessas fases diminui. Essa diminuição pode ocorrer até que a linha de amarração seja reduzida a um ponto crítico, local onde as propriedades termodinâmicas intensivas são iguais e o sistema se apresenta monofásico (Rodrigues, 2012; Borges, 2014; Santos, 2014).

1.4.2. Aplicação do SAB na Extração de Íons Metálicos

Em geral, os trabalhos aplicando os SAB na extração de íons metálicos são conduzidos de três formas: na ausência de qualquer agente extrator; na presença de um agente extrator solúvel em água ou utilizando-se um

complexante do metal ligado ao polímero (Da Silva et al., 2006; Rogers et al., 1993; Rogers et al., 1995).

De maneira geral, a forma de SAB mais empregada na extração de íons é aquela em que se utilizam complexantes solúveis em água, podendo os mesmos ser de origem orgânica ou inorgânica. A utilização desses complexantes proporciona uma melhoria na partição dos íons metálicos para a fase rica em polímero. Isso ocorre por causa da maior interação do complexo metálico formado com os componentes presentes na fase rica em polímero (fase superior). Dessa forma, o tipo e a concentração do complexante a ser utilizado são importantes, pois podem otimizar a extração/separação de um grupo de metais em uma amostra, tornando o processo mais seletivo (Da Silva et al., 2006; Santos, 2014).

Na literatura há trabalhos abordando a aplicação de SABs à extração de íons metálicos como ouro (Zhang *et al.*, 2001; Bulgariu, 2011), bismuto (Graber *et al.*, 2000), níquel (Yoshikuni *et al.*, 2005), cobre (De Lemos *et al.*, 2012), zinco (Bulgariu, 2007), chumbo (Silvestre *et al.*, 2010), mercúrio (Bulgariu, 2006), entre outros. Além desses, também foram encontrados trabalhos que aplicaram SAB a extrações seletivas de metais em presença de outro íon metálico, tais como, níquel/cobalto (Rodrigues *et al.*, 2013; Patrício *et al.*, 2011), ferro/titânio/magnésio (Xie *et al.*, 2011), e outros.

A **Tabela 1.3** reúne alguns trabalhos que utilizaram os SAB na extração de íons Cd(II) e Pb(II), obtendo percentuais de extração (%E) acima de 85,5%. Esses íons foram seletivamente particionados para fase superior (fase rica em polímero), utilizando, na maioria dos trabalhos, os íons haleto ou tiocianato como agentes extratores. Porém, na maioria desses trabalhos o SAB foi otimizado diretamente em meio aquoso e/ou em lixiviado de componentes eletrônicos, sendo o enfoque maior a eficiência de extração e não na pré-concentração dos analitos. Não foi encontrado na literatura trabalhos que propusessem o procedimento do SAB diretamente na amostra de interesse, o leite, visando extração e pré-concentração simultâneas.

Tabela 1.3. Alguns trabalhos encontrados na literatura que abordam a extração de Cd (II) por SAB, usando o iodeto como agente extrator.

SAB	Íons	Extrator	%E _{máx}	Ref.
L35+Na ₂ SO ₄ +Água	Cd(II)	Iodeto	98	Rodrigues et al., 2008
L35+Li ₂ SO ₄ +Água	Cd(II)	Iodeto	99,2	Lacerda et al., 2009
PEG(1550)+(NH ₄) ₂ SO ₄ +Água	Cd(II)	Iodeto	89,2	Bulgariu, 2008
PEO+(NH ₄) ₂ SO ₄ +Água	Cd(II)	Iodeto	99,2	Bulgariu, 2007
PEO+(NH ₄) ₂ SO ₄ +Água	Cd(II)	Iodeto	96,4	Bulgariu, 2013
L64+Na ₂ C ₄ H ₄ O ₆ +Água	Cd(II)	Iodeto	66,4	Rodrigues et al., 2013

1.5. Vinho

O vinho tem sido uma bebida amplamente consumida no mundo há séculos com valor comercial e importância social. A palavra vinho origina-se da palavra latina *vinum*, que por sua vez tem origem na palavra grega *oinos* que tanto podem significar "vinho" como "videira" é, genericamente, uma bebida alcoólica produzida por fermentação do sumo de uva (Enciclopédia Britânica On-line). Numerosos estudos mostraram que o consumo moderado de vinho, especialmente os vinhos tintos, melhora a boa saúde e a longevidade (Goldberg & Bromberg, 1996; Gronbaek et al., 1995).

O vinho é obtido a partir da fermentação alcoólica da uva madura e fresca ou suco de uva fresco. De maneira mais específica esse produto é caracterizado como bebida proveniente da fermentação alcoólica dos açúcares de suco de uva pelas leveduras e, em alguns casos, pelas bactérias lácticas (Aquarone, 2001). Em sua maior parte o vinho é composto por água e em menores quantidades outros constituintes tais como açúcares, alcoóis, ácidos orgânicos, componentes inorgânicos e orgânicos, compostos fenólicos, pigmentos, substâncias nitrogenadas, pectinas, ésteres, aldeídos, cetonas, vitaminas, sais e anidrido sulfuroso (SO₂) (Souza et al., 2006; Ali et al., 2010).

Os principais constituintes inorgânicos do vinho são os ânions minerais, sulfato, fosfato, cloreto e sulfito, e, os orgânicos, tartarato, malato e lactato, além de alguns cátions como o K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Al^{3+} e Cu^{2+} (Vogt, 1986). Os fenóis presentes no vinho desempenham papel importante, pois conferem a coloração e grande parte do sabor, além de proteger a uva contra fungos, bactérias, vírus e a radiação solar (Das et al., 2007). Os compostos polifenólicos são encontrados principalmente na casca, semente e polpa da uva (Ribeiro & Manfroi, 2010), apresentam propriedade de coagular as proteínas dessa bebida e influencia na clarificação (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

O SO_2 é um componente requerido para a elaboração de um vinho, o limite máximo permitido varia de acordo com a legislação de cada país. No Brasil é permitido o uso de até 350 mg L^{-1} como SO_2 total. O conhecimento do pH é de suma importância, constituindo um importante dado para avaliar a resistência contra infecção bacteriana, tendência a “*casse ferrica*” ou porcentagem de SO_2 presente na forma livre (Aquarone, 2001). Além do SO_2 há outros elementos inorgânicos que podem influenciar nas propriedades organolépticas do vinho como por exemplo o cobre (Cu), que é um elemento essencial e um elemento potencialmente tóxico para os seres humanos quando em excesso (Riganakos & Veltsistas, 2003).

Além do cobre outros elementos, tais como Mn e Fe, apresentam características importantes. Isso porque, esses cátions são indispensáveis ao desenvolvimento de leveduras e bactérias lácticas (Ribéreau-Gayon et al., 1998), agindo como co-fatores na atividade de enzimas, tais como as oxirredutases e as quinases (Catarino et al., 2007). O Cu e os íons Fe, Al e Zn, contribuem para formação de neblina e às vezes efeitos de sabor do vinho (Riganakos & Veltsistas, 2003).

A determinação de outros elementos, como Pb, As, ou Cd é importante devido aos seus potenciais efeitos tóxicos, mesmo quando presentes em pequenas concentrações. Além disso, a composição mineral do vinho reflete a sua origem e percurso particulares, sendo por isso singular e identificadora, contribuindo de forma substancial para as características sensoriais, com influência na cor, limpidez, gosto e aroma (Krystyna, 2004; Catarino et al., 2007).

Os métodos oficiais para a análise elementar de amostras de vinho recomendados pela Organização Internacional do Vinho (OIV) e pela American Society of Enologists são também baseados em espectrometria de absorção atômica (AAS) devido à sua seletividade, alta sensibilidade e capacidade para medições diretas (Pyrzynska, 2004). As principais técnicas analíticas utilizadas para analisar amostras de vinho são (**Tabela 1.4**): espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) (Kment et al., 2005), espectrometria de absorção atômica eletrotérmica (ET AAS) (Ivanova-Petropulos et al., 2015; Moreno et al., 2007). Além dessas técnicas também é muito utilizada as de emissão atômica, principalmente para análise multielementar, como a espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado (ICP OES) (Ziola-Frankvska & Frankovski, 2017; Vystavna et al., 2014; Rodrigues et al., 2011; Alkis et al., 2014; Dalipi et al., 2016) e espectrometria de massa de plasma acoplada indutivamente (ICP-MS) (Aceto et al., 2013; Almeida et al., 2002; Rodrigues et al., 2011).

Tabela 1.4. Métodos de análise de analitos inorgânicos em vinho.

Elemento	Preparo da amostra	Técnica	Recuperação %	DPR %	Referência
Fe	Digestão (mistura HNO ₃ /H ₂ O ₂) em frasco Kjeldahl.	FAAS	—	—	Alkis et al., 2014
Cu Fe	Digestão via úmida em chapa de aquecimento.	FAAS	104,7 99,4	—	Malinowski et al., 2016
Pb Cd	Análise direta.	GF AAS	99,7 99,5	4,26 4,9	Ivanova-Petropulos et al., 2015
Mn, Ni, Pb, Cr, Cu, Zn, Co, Cd	Digestão (mistura HNO ₃ /H ₂ O ₂) em frasco Kjeldahl.	GF AAS	—	—	Alkis et al., 2014
Cr, Cu, Pb, Zn, Ni	Digestão com mistura HNO ₃ /H ₂ O ₂	ICP OES	94-112		Vystavna et al., 2014
Al, AS, B, Ba, Ca, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb, Sr, Zn	Diluição com água ultrapura contendo HNO ₃ 2%.	ICP-MS	71-129	4-14	Rodrigues et al., 2011
Li, Be, V, Mn, Co, Ni, Cu, Ge, As, Rb, Sr, Mo, Cd, Ba, Hg, Tl, Pb, Bi	Digestão ácida (HNO ₃ /H ₂ O ₂) por micro-ondas.	ICP-MS	—	1,9- 8,3	Ascarate et al., 2015
Li, V, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, As, Rb, Sr, Ba, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Lu, Pb	Digestão ácida (HNO ₃ /H ₂ O ₂) por micro-ondas.	ICP-MS	85-120	0,8- 28	Marisa et al., 2002

1.6. Cerveja

A cerveja é uma bebida amplamente consumida em todo o mundo e tem origem suméria, datando de 8000 anos. Nesse período a bebida fazia parte da dieta e tinha funções medicinais (Bamforth, 2002; Hornsey, 2003; Bamforth, 2009). Ela chegou ao Brasil em 1634, primeiramente, trazida pelos holandeses e posteriormente, pela Família real portuguesa em 1808. Alguns anos depois

foi fabricada no Brasil a primeira cerveja que recebeu o nome de “Cerveja Brasileira”. Esse momento foi registrado pelo Jornal do Commercio do Rio de Janeiro na edição de 27 de outubro de 1836 (Santos, 2003). Essa bebida é obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com a adição de lúpulo (Brasil, 2009).

O malte fornece algumas propriedades importantes, tais como o corpo, aroma e gosto da cerveja, além de enzimas que degradam amidos e proteínas em açúcares simples e a aminoácidos, respectivamente (Bamforth, 2000). No processo de aquecimento a cerveja adquire cor e gosto, porque esses açúcares podem sofrer caramelização e reações de Maillard (De Keukeleire, 2000).

O malte pode ser substituído por outros componentes que são chamados ingredientes adjuntos do malte. Estes são compostos formados por carboidratos não maltados (não são provenientes do malte) com composição e propriedades que complementam de forma benéfica o malte de cevada. Esses ingredientes são adicionados à cerveja por diversos motivos, tais como menor custo comparado ao malte, aumento da capacidade da brassagem (primeira etapa do processo de fabricação da cerveja) e produção da bebida mais clara (Silva & Faria, 2008; Araújo et al., 2003).

Outro constituinte importante presente na cerveja é o lúpulo, que confere algumas características organolépticas imprescindíveis na bebida. Dentre elas destaca-se a função aromatizante e o amargor, mas também é capaz de esterilizar o mosto de forma natural e estabilizar a espuma (Bamforth, 2000).

O produto final da mosturação é o mosto, que é uma suspensão de particulados em água. Ao mosto é adicionado o lúpulo e então são fervidos a 100 °C, ocorrendo a inativação de enzimas e esterilização. Após resfriamento, a levedura é inoculada para o início da fermentação. O produto obtido desta fermentação é a cerveja verde. Esta possui leveduras em suspensão e açúcares, necessitando de um tempo de condicionamento (Siqueira et al., 2008). Em seguida é realizada a maturação que é uma fermentação secundária proveniente do consumo do carboidrato residual pelas leveduras remanescentes. Esse processo é capaz de remover produtos secundários, como o acetaldeído, sulfeto de hidrogênio, melhorar o gosto e clarificar a

cerveja (Rosa & Afonso, 2015; Siqueira et al., 2008). A **Figura 1.5** ilustra todas as etapas do processo de produção da cerveja.

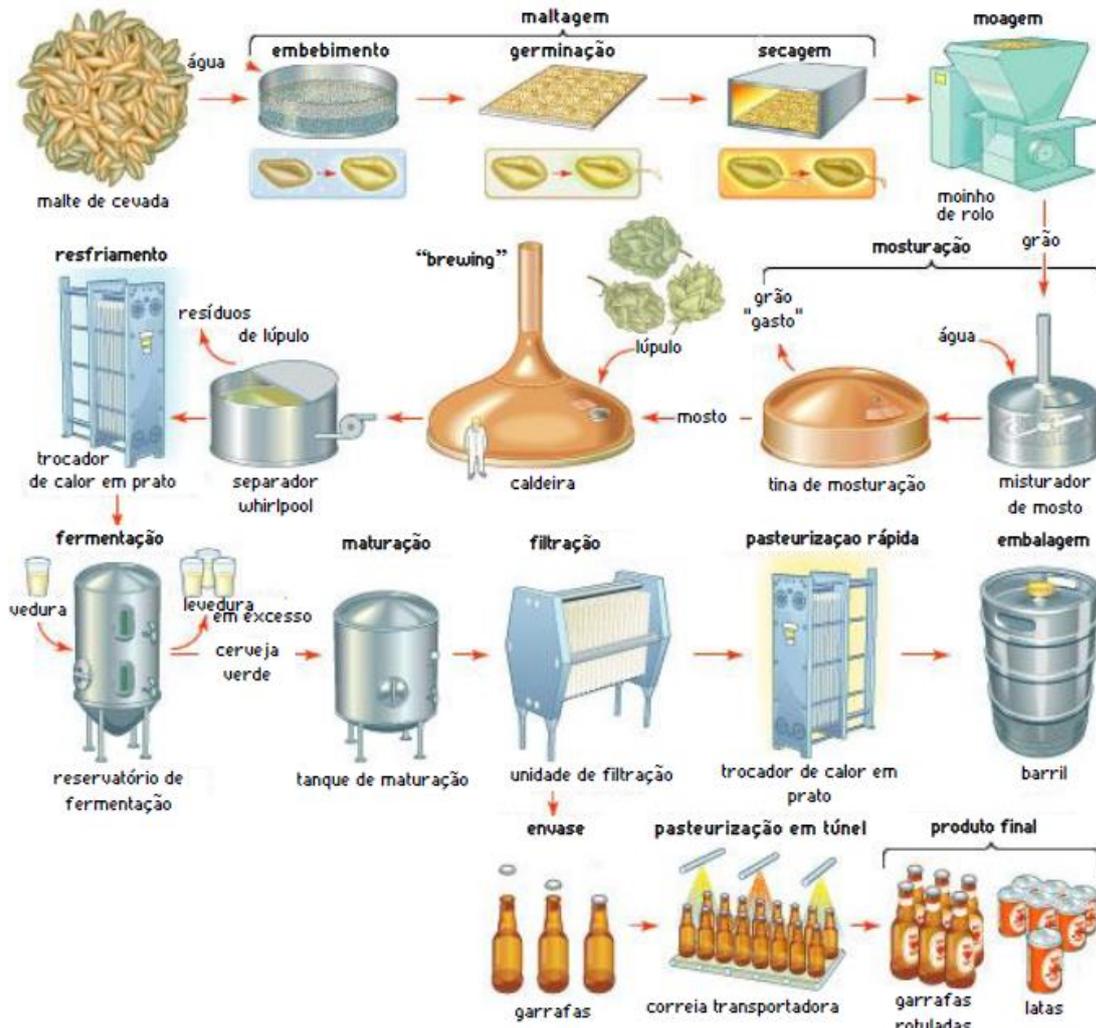


Figura 1.4. Processo de produção de cerveja

Fonte: Young, 2009 na Enciclopédia Britânica on-line, adaptada.

O controle de qualidade da cerveja é feito da maltagem até o envase, realizando-se análises físico-químicas de acidez, microbiológicas e sensoriais, garantindo que a bebida cumpra as exigências dos órgãos responsáveis e principalmente do paladar do consumidor (Rosa & Afonso, 2015). Além disso, a legislação brasileira controla as concentrações de íons arsênio, cádmio e chumbo nessa bebida (ANVISA, 2013).

1.6.1. Determinação dos Constituintes Inorgânicos da Cerveja

Os métodos oficiais para análise de cerveja promovem a destruição da matéria orgânica antes da medida por espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS) (Watson, 1994). Esse método envolve digestão ácida com H_2SO_4 e H_2O_2 em chapa de aquecimento, consumindo tempo e propenso a perdas e contaminações (Bellido-Milla et al., 2000). Na literatura podem ser encontradas várias técnicas analíticas utilizadas para analisar amostras de cerveja, tais como espectrometria de absorção atômica de chama (FAAS) (Fantozzi et al., 1998; Bellido-Milla et al., 2000, 2004; Onate-Jaen et al., 2006; Pohl 2007b; Pohl & Prusisz 2007; Pohl & Prusisz, 2010; Filik & Giray, 2012), espectrometria de absorção atômica eletrotérmica (ET-AAS) (Wagner et al., 1991; Sharpe and Williams 1995; Wagner 1995; Svendsen & Lund 2000; Vinas et al., 2002; Asfaw e Wibetoe 2005; Llobat-Estelles et al., 2006). Além dessas técnicas também é muito utilizada a técnica de emissão atômica, principalmente para análise multielementar, como a espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado (ICP OES) (Alcazar et al., 2002; Bellido-Milla et al., 2004; Pohl & Prusisz 2004; Asfaw & Wibetoe 2005; Sedin 2005, 2006) e espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) (Wyrzykowska et al., 2001; Passaghe et al., 2015; Voica et al., 2015).

Outra possibilidade, tanto para a análise de cerveja (Gama et al., 2017) quanto de vinho (Anjos et al., 2003; Dalipi et al., 2016; Gruber et al., 2006; Pessanha et al., 2010) é a utilização da espectrometria de fluorescência de raios - X por reflexão total (TXRF). Esta técnica analítica pode ser aplicada a uma grande variedade de matrizes, independentemente do seu estado físico: materiais biológicos (Guimarães et al. 2012), vegetais (Necemer et al., 2009), produtos farmacêuticos e medicamentos (Cinosi et al., 2011), sedimentos e fertilizantes (Resende et al., 2016), nanomateriais (Borgese et al., 2011) e materiais arqueológicos (Wobrauschek, 2007; Cariati et al., 2003) entre outros. Além disso, os procedimentos de calibração de TXRF são mais simples do que aqueles necessários para outras técnicas multielementares, como ICP-MS (Bruker, 2012). Alguns desses trabalhos podem ser observados na tabela abaixo (**Tabela 1.5**), onde também pode ser verificado os procedimentos de preparo da amostras utilizados.

Tabela 1.5. Métodos de análise dos analitos inorgânicos da cerveja.

Elemento	Preparo da amostra	Técnica	Recuperação %	DPR %	Referência
Fe	Digestão (mistura HNO ₃ /H ₂ O ₂) em frasco Kjeldahl.	FAAS	—	—	Alkis et al., 2014
Cu Fe	Digestão via úmida em chapa de aquecimento.	FAAS	104,7 99,4	—	Malinowski et al., 2016
Pb Cd	Análise direta.	GF AAS	99,7 99,5	4,26 4,9	Ivanova-Petropulos et al., 2015
Mn, Ni, Pb, Cr, Cu, Zn, Co, Cd	Digestão (mistura HNO ₃ /H ₂ O ₂) em frasco Kjeldahl.	GF AAS	—	—	Alkis et al., 2014
Cr, Cu, Pb, Zn, Ni	Digestão com mistura HNO ₃ /H ₂ O ₂	ICP OES	94-112		Vystavna et al., 2014
Al, AS, B, Ba, Ca, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb, Sr, Zn	Diluição com água ultrapura contendo HNO ₃ 2%.	ICP-MS	71-129	4-14	Rodrigues et al., 2011
Li, Be, V, Mn, Co, Ni, Cu, Ge, As, Rb, Sr, Mo, Cd, Ba, Hg, Tl, Pb, Bi	Digestão ácida (HNO ₃ /H ₂ O ₂) por micro-ondas.	ICP-MS	—	1,9-8,3	Ascarate et al., 2015
Li, V, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, As, Rb, Sr, Ba, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Lu, Pb	Digestão ácida (HNO ₃ /H ₂ O ₂) por micro-ondas.	ICP-MS	85-120	0,8-28	Marisa et al., 2002

1.7. Espectrometria de Fluorescência de Raios-X por Reflexão Total

A fluorescência de raios-X por reflexão total (TXRF) é uma técnica analítica quali-quantitativa e bem consolidada com relação a análise de matérias líquidas e sólidas. A TXRF é uma variante da fluorescência de raio-X por energia dispersiva (EDXRF) e é uma poderosa técnica analítica

multielementar devido a faixa elementar detectável e a simplicidade de detecção e quantificação (S. Dhara, et al., 2012; Klockenkämper & Von Bohlen, 1996). A reflexão total dos fótons de raios-X primários nas placas de suporte faz com que a eficiência de excitação seja maior, resultando em limites de detecção mais baixos. A formação de uma camada fina de amostras líquidas ou sólidas torna possível a eliminação dos efeitos da matriz e a aplicação da padronização interna (De La Calle et al, 2013; Guimarães et al. 2012). Amostras líquidas e sólidas digeridas podem ser analisadas diretamente por TXRF.

Na técnica de EDXRF o ângulo de incidência e de reflexão são aproximadamente 45/45 e na TXRF são 0,1/90 (Klockenkämper & Von Bohlen, 1996). Essa diferença de geometria causa reflexão total dos raios-X, pois o feixe de radiação atinge a amostra com um ângulo muito pequeno, sendo minimizada a interação com o substrato. A radiação emitida é detectada perpendicularmente muito próxima da amostra (3 a 5 mm), aumentando a eficiência de detecção de raios-X, uma vez que a relação sinal analítico / ruído é maximizada (De La Calle et al, 2013). A **Figura 1.7** representa essa diferença de ângulos entre os raios de incidência e reflexão das duas técnicas.

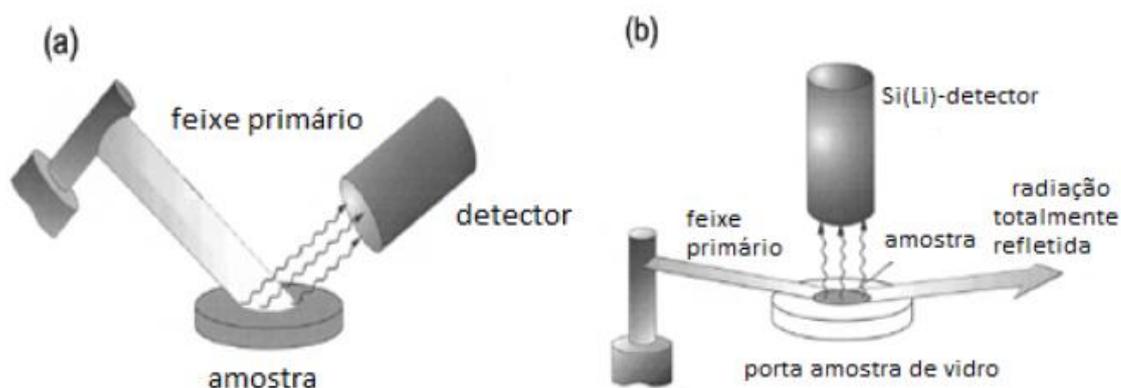


Figura 1.6. Arranjo simplificado usado para (a) XRF convencional e para (b) TXRF. (Klockenkämper & Von Bohlen, 2001).

As vantagens TXRF incluem: i) a capacidade de análise simultânea multielementar - tipicamente do Na ao U; ii) análise qualitativa e quantitativa de amostras sólidas e líquidas, muitas vezes com preparação mínima; iii) utiliza pequena quantidade de da amostra (μL ou μg); iv) baixo ruído de radiação de

fundo (fundo); v) calibração simples com o uso de padrões internos (IS); vi) limites de detecção baixos (na ordem de ppb); vii) ampla faixa de medidas ($\mu\text{g kg}^{-1}$ em%); viii) operação fácil, sem consumo de gás ou água para refrigeração e ix) análise relativamente curta (100 -1000 segundos) (De La Calle et al, 2013; Guimarães et al. 2012).

No entanto, o TXRF apresenta desvantagens quanto à resolução espectral e aos picos sobrepostos, o que pode resultar em valores excedentes ou inferiores para elementos presentes em baixas concentrações. Também é característico de outras técnicas que utilizam detectores de semicondutores (SSD). Além disso, uma desvantagem adicional associada à técnica é a incapacidade de detectar elementos que são usados para gerar raios - X para a excitação da amostra (Klockenkämper & Von Bohlen, 1996).

1.7.1. Análise Quantitativa em TXRF

Na técnica TXRF, as quantidades de amostras utilizadas geralmente são muito pequenas (μL , μg) e, portanto, podem ser consideradas como filmes finos. Além disso, para a análise quantitativa é suficiente apenas uma calibração simples pela adição de padrão interno às amostras, permitindo a correção de fatores como flutuações no gerador de raios-X e outras instabilidades do sistema. Para isso, o elemento escolhido como padrão interno não deve estar presente na amostra, ou ocorrer em concentrações muito baixas, e também não deve apresentar interferência espectral com os elementos a serem quantificados. Assim, os padrões internos mais utilizados são Ga, Y e Ge (Dhara, et al., 2012). A equação básica (**Equação 1.5.2.1**) para análise quantitativa é aquela que relaciona a intensidade de raios-X característicos, com sensibilidade elementar, como mostrado abaixo:

$$I_i = C_i \cdot S_i \quad (1.5.2.1)$$

Onde I_i é a intensidade (cps) da linha $K\alpha$ ou $L\alpha$ característica emitida, C_i é a concentração (mg L^{-1} ou mg kg^{-1}) do analito i na solução analisada, S_i é a sensibilidade elementar do sistema (cps/ppm - mg L^{-1} ou mg kg^{-1}) para o analito i . A equação para o padrão interno, **Equação 1.5.2.2**, é descrita como:

$$I_p = C_p \cdot S_p \quad (1.5.2.2)$$

A sensibilidade relativa do elemento é um valor adimensional que indica a relação entre a intensidade do pico do analito e a quantidade na amostra. Geralmente, as sensibilidades relativas podem ser determinadas pelo cálculo de parâmetros fundamentais, como a probabilidade de excitação, a eficiência do detector, entre outros. No entanto, uma maneira simplificada de obter o valor de S'_i é analisando uma solução multielementar de concentrações conhecidas e calculando o fator de sensibilidade que se baseia no pico de cada elemento (Bruker, 2012). O valor da sensibilidade relativa pode ser determinado dividindo a **Equação 1.5.2.1** por **1.5.2.2**, a relação de sensibilidade do analito e a sensibilidade do padrão interno, resultando na **Equação 1.5.2.3**.

$$S'_i = \frac{I_i C_p}{I_p C_i} \quad (1.5.2.3)$$

Para o cálculo da concentração analítica é suficiente rearranjar a **Equação 1.5.2.3**, resultando na **Equação 1.5.2.4**:

$$C_i = \frac{I_i C_p}{I_p S'_i} \quad (1.5.2.4)$$

Vários estudos têm demonstrado as potenciais aplicações da TXRF na área de alimentos e também na análise de água. A **Tabela 1.6** apresenta alguns trabalhos encontrados na literatura.

Tabela 1.6. Aplicação da TXRF na análise de amostras de alimentos e água.

Elementos	Amostras	Referência
K, Ca Ti, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Se, Br, Sr	Mel	Ribeiro et al., 2014
S, Cl, K, Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Br, Rb, Ba	Água mineral	Georgieva et al., 2013
K, Ca, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Rb, Sr, Ba, Pb	Água	Borgese et al., 2014
Fe, Cu, Zn	Cachaça	Silva et al., 2004
K, Ca, Mn, Fe, Cu, Rb, Sr	Vinho	Gruber et al., 2006
Cl, K, Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Br, Rb, Sr, Pb	Vinho	Dalipi et al., 2015
P, S, Cl, K, Ca, Zn, Br, Rb, Sr	Leite	Smagunova et al., 2013
K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn	Alho	Alvarez et al., 2003
P, S, Cl, Ca, K, Mn, Fe, Cu, Ni, Zn, Br, Rb	maçã	Bat et al., 2012
Mn	Abacaxi	Patz et al., 2013
P, S, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Cu, Zn, Br, Rb	Peixe	Espinoza-Quinones et al., 2011
Ti, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Se, Br, Sr, Hg, Pb, Cd	Mexilhões	Marguí et al., 2014
Ba, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Rb, Se, Sr, V, Zn	Ovos de galinha	Vincevica-Gaile et al., 2013
Se	Suplemento alimentar	Stosnach, 2010
Ca, Ti, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Br, Rb, Sr, Pb	Doces	Martinez et al., 2010

1.8. Validação

Validar, em análise química, é estar voltado para a confiabilidade analítica do laboratório e do método escolhido ou desenvolvido para se obter o resultado (Leite, 2008). O objetivo da validação é demonstrar que o método analítico é adequado para seu propósito (Walsh, 1999)

Na literatura podem ser encontrados diversos guias que auxiliam na validação de procedimentos analíticos, visando garantir a qualidade metrológica dos resultados analíticos, conferindo-lhes rastreabilidade, comparabilidade e confiabilidade (MAPA, 2011, Souza, 2005).

Todo procedimento de validação de qualquer método analítico deve estar documentado, e ainda, devem ser realizados estudos para determinação de alguns parâmetros de desempenho (INMETRO, 2011; Souza, 2014). Os parâmetros de validação, ou também chamados figuras de mérito, descritos na literatura e em Guias de Validação incluem: seletividade, linearidade, faixa de trabalho e faixa linear, sensibilidade, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), precisão, tendência, recuperação e robustez (INMETRO, 2011; MAPA, 2011; Ribeiro, 2008; Souza, 2013; Souza, 2007). Porém, a extensão do processo de validação e a escolha das figuras de mérito a serem avaliadas dependem das condições do método e do tipo de ensaio, logo nem todos são aplicáveis (Souza, 2005; Ribeiro, 2008).

A definição de linearidade é a capacidade ou habilidade de um método analítico produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, em uma dada faixa de concentração (INMETRO, 2011; MAPA, 2011). Essa proporcionalidade é representada por uma equação matemática denominada curva de calibração ou curva analítica. Esta equação relaciona o sinal analítico, chamado de variável dependente y , e sua concentração, denominada variável independente x , como pode ser verificada pela **Equação 1.7.1**, que, normalmente é ajustada pelo método dos mínimos quadrados ordinários (Ribeiro, 2008, INMETRO, 2011).

$$y = ax + b + e_i \quad (1.7.1)$$

onde a e b são os parâmetros estimados da equação (intercepto e coeficiente angular, respectivamente) e e_i os resíduos da regressão (Souza, 2007).

A inspeção visual do gráfico do sinal analítico pela concentração pode ser feita com base no coeficiente de correlação linear e com isso verificar se a reta gerada na **Equação 1.7.1** é adequada como modelo matemático (INMETRO, 2007). Porém, só inspeção do valor do coeficiente de correlação não é suficiente para garantir o ajuste linear da curva de calibração, uma vez que bons coeficientes de correlação podem ser obtidos de modelos de

calibração com alto resíduo de sinal analítico ou com pontos mal distribuídos ao longo da curva (Ribeiro, 2008).

Com o objetivo de superar essa limitação da avaliação da curva de calibração, o INMETRO (2011) recomenda a verificação da ausência de valores discrepantes (*outliers*) em cada nível de concentração. Para isso utiliza-se o teste de Grubbs ou de resíduos Jackknife. Também é importante avaliar se os dados são homoscedásticos e isso é feito realizando o teste de Cochran ou o teste de Levene ou ainda o de Brown-Forsythe, antes de realizar a regressão linear.

Além disso, Souza e Junqueira (2005) recomendam ainda realizar uma análise mais detalhada dos resíduos além da exclusão de valores extremos e a homoscedasticidade. Esse procedimento pode ser feito empregando mais dois testes estatísticos, o teste de Ryan-Joiner e o teste de Durbin-Watson, para a avaliação da normalidade e o da independência dos resíduos, respectivamente. Simultaneamente esses autores sugerem uma simples inspeção visual do gráfico dos resíduos do sinal analítico. Isso porque, este permite detectar problemas de falta de ajuste da curva, amostras atípicas, variâncias não constantes (heterocedasticidade), correlação entre os erros ou que os resíduos estão adequados ao modelo (Ribeiro, 2008; MAPA, 2011), como exemplificado nos gráficos da **Figura 1.7**.

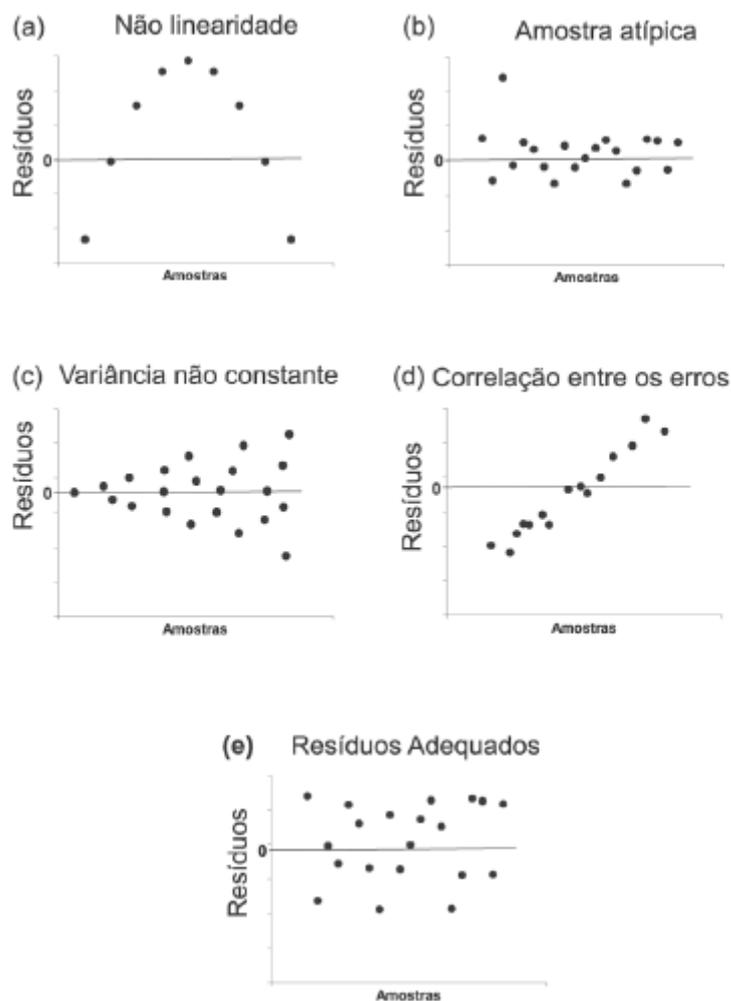


Figura 1.7. Gráfico dos resíduos mostrando (a) desvios da linearidade, (b) amostras atípicas, (c) heterocedastidade, (d) erros correlacionados e (e) resíduos com homocedastidade e normalmente distribuídos (Ribeiro, 2008).

O INMETRO (2011) recomenda fazer a análise de variância (ANOVA) na regressão para se ter maior segurança na expressão dos resultados analíticos. Todos os testes estatísticos descritos anteriormente para avaliação das premissas da linearidade da curva de calibração estão descritos de forma abrangente em Souza (2007). Contudo, há procedimentos analíticos em que a linearidade não é demonstrada mesmo após as verificações discutidas anteriormente. Neste caso, tanto o INMETRO (2011) quanto o MAPA (2011) recomendam que a resposta analítica seja descrita por outra função, que não a linear, como, por exemplo, um polinômio de segundo grau, mas que seja capaz de modelar a concentração do analito na amostra.

A seletividade fornece é a capacidade que o método apresenta em determinar os analitos em misturas ou matrizes sem que outras espécies de comportamento semelhante interfiram no sinal analítico, alterando a magnitude da concentração (MAPA, 2011; INMETRO, 2011; Souza, 2014; Teixeira, 2014). A seletividade é avaliada a partir da capacidade de identificação do analito de interesse na presença de interferentes, ou estudo do efeito de matriz. Para isso, pode-se envolver ensaios com padrões ou materiais de referência, preparo de amostras com e sem o analito (INMETRO, 2011; Teixeira, 2014).

A sensibilidade do método é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito, ou seja, para uma curva linear é expressa como a inclinação da reta de regressão (INMETRO, 2011). Se dois métodos têm igual precisão, o mais sensível é o que possui a curva de calibração com maior inclinação (Leite, 2008).

O limite de detecção (LD) é a concentração mínima de analito (maior que zero) que pode ser detectada a 95% ou 99% de confiança. O limite de quantificação (LQ) é definido como a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de exatidão e precisão. As **Equações 1.7.2 e 1.7.3** apresentam as fórmulas para se calcular o LD e LQ, respectivamente (INMETRO, 2011).

$$LD = X + t_{(n-1,1-\alpha)} \cdot s \quad (1.7.2)$$

$$LQ = X + 10 \cdot s \quad (1.7.3)$$

sendo X a média das concentrações dos brancos da amostra e s o desvio-padrão dos brancos da amostra.

A precisão avalia a dispersão de resultados entre ensaios independentes em torno da média, em condições definidas. Ela é comumente determinada por meio da repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade, sendo comumente expressa pelo desvio padrão relativo (DPR) ou também conhecido como coeficiente de variância (CV), **Equação 1.7.4** (INMETRO, 2011; Teixeira, 2014; Souza, 2014).

$$CV(\%) = DPR = \frac{s}{X} \times 100 \quad (1.7.4)$$

onde s é o desvio padrão e X é a concentração média determinada.

A exatidão, numericamente calculada através da tendência, reflete a proximidade entre o valor medido e o valor de referência considerado verdadeiro. Os ensaios utilizados para avaliar a tendência envolvem procedimentos utilizando materiais de referência certificados (MRC), participações em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação. Utiliza-se para cálculo da tendência a **Equação 1.7.5**, nos dois primeiros tipos ensaios a **Equação 1.7.6**, para o último tipo de ensaio citado (INMETRO, 2011; Ribeiro, 2008; Leite, 2008).

$$Tendência = \frac{\text{valor medido}}{\text{valor de referência}} \times 100 \quad (1.7.5)$$

$$Tendência (Recuperação) = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad (1.7.6)$$

sendo C_1 a concentração do analito na amostra fortificada, C_2 a concentração do analito na amostra não fortificada e C_3 a concentração do analito adicionada à amostra fortificada.

Capítulo 2

DETERMINAÇÃO DE CÁDMIO EM AMOSTRAS DE LEITE BOVINO EMPREGANDO SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO

CAPÍTULO 2: DETERMINAÇÃO DE CÁDMIO EM AMOSTRAS DE LEITE BOVINO EMPREGANDO SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO

2.1. Introdução

O leite é uma substância proveniente da glândula mamária de mamíferos e que contém nutrientes essenciais para o desenvolvimento humano. Porém, essa bebida pode conter contaminantes tóxicos e colocar em risco a saúde dos consumidores (Ataro et al., 2008; Maas et al., 2011). Dentre esses contaminantes estão os metais potencialmente tóxicos (Loska et al., 2004), os quais possuem duas origens principais: atividades antrópicas (Imperato et al., 2003) e geológicas (Baize et al., 2001). O cádmio (Cd) está entre esses metais e tem se destacado por ser encontrado naturalmente em rochas fosfáticas, utilizadas na fabricação de insumos agrícolas que pode resultar em importante fonte de contaminação ambiental. O Cd é um metal de meia vida biológica extremamente longa no organismo humano, sendo que os rins são os órgãos críticos para os efeitos tóxicos relativos à exposição crônica, bem como um potente agente cancerígeno (Goyer et al., 1996; Tripathi et al., 1999; Baird, 2013). Assim como o Cd, outros elementos tóxicos podem ser liberados no meio ambiente por duas vias principais: atividades antrópicas (Imperato et al., 2003) e geológicas (Baize et al., 2001).

A determinação sensível e precisa de Cd com relação ao nível de traços em matrizes complexas, tais como leite e alimentos em geral, é um dos pontos importantes da química analítica (Ghaedi et al., 2006; Rahimi et al., 2013; Xiang et al., 2012). A quantificação desse elemento traço em amostras alimentícias tem sido rotineiramente realizada por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) (He et al., 2008), espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (Hammer et al., 2005; Nam et al., 2006), espectrometria de absorção atômica por forno de grafite (GFAAS) (De Amorim et al., 2011) e espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS) (Lemos & David, 2010; Lemos et al., 2007; Liu et al., 2007).

Em comparação com outras técnicas analíticas, a FAAS apresenta características desejáveis, tais como menor custo, facilidade operacional,

elevada frequência analítica e boa seletividade (Pereira & Arruda, 2003). No entanto, a determinação direta de cádmio em amostras de alimentos é muitas vezes difícil, não só devido à baixa concentração, mas também por causa dos efeitos da matriz. Para resolver este problema, recorre-se aos procedimentos de separação e/ou pré-concentração antes da análise. Essa etapa é muito importante para a melhoria da sensibilidade, e ainda, a separação é um método eficiente para reduzir a interferência da matriz da amostra (Sadeghi & Sheikhzadeh, 2009; Xiang et al., 2012).

Uma metodologia que pode ser utilizada na extração e quantificação de íons metálicos, tais como Cd(II), é o uso de sistemas aquosos bifásicos (SAB). A aplicação desses sistemas não exige destruição da matéria orgânica, é ambientalmente seguro, simples, de baixo custo e não há necessidade de utilização de solventes orgânicos (Lacerda et al., 2009; Rodrigues et al., 2011)

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivo Geral

Desenvolver e validar um método analítico rápido e ambientalmente amigável para a determinação de Cd(II), visando controle de qualidade de leite bovino aplicando sistemas aquosos bifásicos (SAB) como forma de preparo de amostras e posterior determinação por FAAS.

2.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a extração e pré-concentração de Cd(II) em leite bovino utilizando o sistema aquoso bifásico;
- Investigar a influência da quantidade de agente extrator, da natureza química do eletrólito e do polímero, do comprimento da linha de amarração, da razão mássica das fases do SAB na eficiência de extração dos íons Cd(II);
- Comparar as condições operacionais do método proposto com outros trabalhos da literatura;
- Determinar Cd(II) por espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS), otimizando as condições operacionais;

- Validar o método proposto, avaliando as figuras de mérito precisão (repetitividade e precisão intermediária), veracidade, linearidade, seletividade (efeito de matriz), limites de detecção e quantificação;
- Aplicar o método validado na análise de diferentes amostras de leite bovino.

2.3. Experimental

2.3.1. Instrumentação Analítica

Para pesagem dos SABs e dos reagentes que seriam utilizados para preparo das soluções foi utilizada uma balança analítica (SHIMADZU, modelo AUW220D, Japão) com uma incerteza de $\pm 0,0001$ g. Uma centrífuga (FANEN, modelo Excelsa II 206 BL, São Paulo, Brasil) foi utilizada para acelerar o processo de separação das fases do SAB e um banho termostático (QUIMIS Aparelhos Científicos LTDA, modelo Dubnoff, São Paulo, Brasil) foi utilizado para manter o equilíbrio térmico dos ensaios de SAB. As determinações analíticas do íon cádmio nas amostras de leite foram realizadas em um espectrômetro de absorção atômica por chama (FAAS), marca Agilent Technologies, modelo SpectrAA-200.

2.3.2. Reagentes e padrões

Todos os reagentes utilizados apresentavam grau analítico e foram utilizados tais como recebido pelo fabricante, sem purificação adicional. Na construção do SAB foram utilizados polímeros poli(etileno) glicol com uma massa molar média de (mM) 1500 g mol^{-1} , poli(etileno) glicol 400 g mol^{-1} , poli(etileno) glicol 6000 g mol^{-1} fornecidos pela Synth (São Paulo, Brasil). O iodeto de potássio (KI), nitrato de cádmio ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$) e ácido nítrico (HNO_3) foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), tartarato de sódio dihidratado ($\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), citrato de sódio trihidratado ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) fornecidos pela Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Milli - Q II água (resistividade $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) (Millipore, Bedford, MA, EUA) foi utilizada no preparo de todas as soluções aquosas.

2.3.3. Coleta e Preparação das Amostras de Leite

As amostras de leite foram coletadas no mercado local, na cidade de Belo Horizonte, MG, Brasil. Os tipos de leite analisados foram integral, desnatado, pasteurizado, fortificado com ferro e zero lactose. O leite integral foi utilizado em toda etapa de otimização e validação, por ser uma amostra mais complexa e com maior teor de gordura. Um volume de 45 mL de leite foi adicionado em frascos de polietileno de 50 mL, aos quais foram adicionados 1 mL de HNO₃ (65%). Essas amostras foram submetidas à centrifugação a uma rotação de 3000 rpm ($F_c = 1569 \times g$, onde g é aceleração da gravidade) por um tempo de 15 minutos para separar a caseína, que foi desprezada, do soro do leite, que foi utilizado para preparar o SAB.

Na preparação do SAB foi medida uma massa de 7,47 g de Na₂SO₄ e solubilizada com uma fração de soro que completasse uma massa final de 40 g. Dessa solução foi retirada uma fração de 12,0 g servir de branco. O restante da solução salina em soro foi utilizado para preparar a solução estoque de Cd(II) 50 µg kg⁻¹, solubilizando 0,1g de nitrato de cádmio. Essas massas foram definidas previamente a partir de dados da literatura (**Tabela 2.1**).

2.3.4. Efeito da Quantidade de Extrator Adicionado

A porcentagem de extração (%E) de íons cádmio foi avaliada pela adição de diferentes quantidades de iodeto (I⁻) na fase superior de cada sistema, em uma faixa de 0 a 280 mmol kg⁻¹, com incrementos de 56 mmol. Utilizou-se uma solução estoque do polímero PEO estabelecida a partir da composição global do sistema para solubilizar o agente extrator iodeto de potássio nas respectivas concentrações desejadas. Para investigar a extração de Cd(II), a porcentagem de extração (%E) dos íons metálicos foi calculada pela **Equação (2.1)**,

$$\%E = \frac{n_M^{TP}}{n_M^T} \times 100 \quad (2.1)$$

onde n_M^{TP} e n_M^T são as quantidades de matéria de metal presentes na fase superior e quantidade total adicionado no sistema, respectivamente.

2.3.5. Efeito do Eletrólito na Extração de Cd (II) no SAB

Outro fator analisado nos testes de extração foi a influência do eletrólito formador do SAB sobre a %E dos íons Cd(II). Para realizar esse estudo foram utilizados três tipos diferentes de eletrólitos na construção do SAB que foram constituídos por PEO1500 + Na₃C₆H₅O₇ + água; PEO1500 + Na₂C₄H₄O₆ + água e PEO1500 + Na₂SO₄ + água. Os sistemas de sulfato de sódio, tartarato de sódio, citrato de sódio foram testados em diferentes concentrações (**Tabela 2.1**). Para o sistema PEO1500 + Na₂SO₄ + água foram estudados quatro composições diferentes para verificar o efeito do comprimento da linha de amarração (CLA) no comportamento de partição do complexo cádmio-iodeto. Na **Tabela 2.1** são apresentadas as composições globais relativas aos SAB constituídos por 2 g de fase superior e 2 g da fase inferior e essa proporção em massa entre as fases superior e inferior foi utilizada durante a toda a etapa de otimização.

Tabela 2.1. Composição em % (m/m) de PEO 1500 (m_p) + sal (m_s) + água SAB (298,0 K) a diferentes comprimentos da linha de amarração (CLA).

CLA / % (m/m)	Fase Global		Fase Superior		Fase Inferior		Ref.
	m_p	m_s	m_p	m_s	m_p	m_s	
PEO 400 + Na₂SO₄ + H₂O							
45,69	22,54	14,47	41,97	2,45	3,12	26,5	MARTINS et al., 2008
PEO 1500 + Na₂SO₄ + H₂O							
32,28	17,42	9,24	32,36	2,84	2,47	15,63	Martins et al., 2008
35,94	18,32	9,97	34,51	2,16	2,12	17,77	Martins et al., 2008
40,10	19,9	10,7	37,94	1,95	1,86	19,45	Martins et al., 2008
46,97	22,22	11,59	43,41	1,46	1,03	21,71	Martins et al., 2008
PEO 6000 + Na₂SO₄ + H₂O							
45,05	21,42	10,65	41,96	1,41	0,88	19,89	Martins et al., 2008
PEO 1500 + Na₃C₆H₅O₇ + H₂O							
4,51	19,56	13,95	38,95	3,02	0,18	24,88	Lemos et al., 2012
PEO 1500 + Na₂C₄H₄O₆ + H₂O							
48,34	21,88	15,29	42,92	3,38	0,85	27,20	Lemos et al., 2012

2.3.6. Procedimento de Montagem do SAB

Os ensaios de extração foram preparados misturando-se massas definidas das soluções poliméricas e salinas, contendo o íon metálico (cádmio) e o extrator iodeto em tubos de polietileno. Estes foram agitados manualmente por 3 minutos, centrifugados a 3000 rpm (1569 x g) por um tempo de 15 minutos, para acelerar o processo de separação de fases. Posteriormente,

esses tubos foram mantidos em banho termostatzado a 25°C por 12 horas, para garantir que o equilíbrio térmico fosse atingido. Foi feito um estudo para avaliar a influência desse tempo.

Em seguida, uma alíquota da fase superior de cada sistema foi recolhida, utilizando-se uma seringa descartável de 1 mL e diluindo a alíquota duas vezes com água deionizada em tubos apropriados para posterior determinação de cádmio por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS). O cálculo da porcentagem de extração (%E) dos íons cádmio foi realizado utilizando a **Equação 2.1**.

2.3.7. Validação do Método Proposto para Cd (II)

Antes de iniciar a etapa de validação foi realizado um teste com uma razão mássica (M_{FS}/M_{FI} de 1/12) de 0,083 para aumentar o fator de pré-concentração em 13 vezes e com isso aumentar a sensibilidade do método. Os parâmetros linearidade, faixa de trabalho, veracidade, precisão (repetitividade) e limites de detecção e de quantificação foram estabelecidos em experimentos com amostras brancas de leite (sem presença do analito) fortificadas com solução padrão de Cd (II). O nível de significância adotado nos testes de hipóteses foi $\alpha = 0,05$.

A avaliação da linearidade foi conduzida conforme procedimentos propostos pelo MAPA (2011). Para o estudo da linearidade foi produzida apenas a curva de calibração por ajuste de matriz, porque as condições experimentais foram realizadas diretamente na matriz leite. Esse procedimento dispensou a construção de uma curva de calibração em meio aquoso (curva analítica) e conseqüentemente não havia necessidade de se realizar o estudo do efeito de matriz.

A curva analítica matrizada foi preparada, nos níveis de concentração 0,0; 25,0; 50,0; 75,0; 100,0; 125,0 e 150,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de cádmio, sendo feitas três replicatas independentes de cada nível, com análises em ordem aleatória. As soluções do branco foram preparadas em dez replicatas independentes para avaliação do ruído, mas não foram incluídos nos cálculos da regressão.

Contudo, esses valores do branco serviram, posteriormente, para estimar o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ).

Os parâmetros da regressão foram estimados pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO). Os *outliers* (valores dispersos) foram formalmente diagnosticados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife (Horwitz, 1995). Este teste foi aplicado sucessivamente até que novos *outliers* não fossem detectados ou até uma exclusão máxima de 22,2% no número original de resultados (Belsley et al., 1980). As premissas relativas à análise de regressão foram verificadas sendo: normalidade (Ryan & Joiner, 1976), homoscedasticidade (Levene, 1960) e independência dos resíduos da regressão (Durbin & Watson, 1951). Testes F foram conduzidos para verificar o ajuste ao modelo linear por meio da avaliação das significâncias da regressão e do desvio da linearidade (Draper, 1998).

Devido à indisponibilidade de materiais de referência certificados devidamente caracterizados para Cd (II), os parâmetros recuperação e precisão (repetitividade e precisão intermediária) foram avaliados em três níveis de concentração, 25; 75 e 125 $\mu\text{g kg}^{-1}$, com seis replicatas independentes de cada nível. Para realizar a precisão intermediária foi repetido o mesmo experimento em outro dia. Os valores adotados como referência para avaliação da recuperação foram os estabelecidos pelo MAPA (2011).

Nos experimentos conduzidos sob a forma de repetitividade, a precisão é expressa em termos de desvio padrão relativo DPR(%) dos resultados de recuperação calculados pela razão entre o desvio padrão das concentrações e a média dessas concentrações multiplicado por cem ($\text{DPR} = 100 \times s / X$), onde s é o desvio padrão da média das concentrações e X é a média das concentrações obtidas para as replicatas de amostras adicionadas em cada nível de concentração.

O limite de detecção foi calculado com base no Guia do MAPA (MAPA, 2011), utilizando a **Equação 2.2**,

$$X \pm t \cdot s_b$$

2.2

onde X é a média das concentrações das amostras, t é o teste t de student e S_b é o desvio padrão das concentrações de dez replicatas

independentes do branco. Também foi calculado o limite de quantificação usando a equação $X \pm 10.s_b$.

2.4. Resultados e Discussão

2.4.1. Otimização do SAB para Extração de Cd(II)

A otimização do sistema aquoso bifásico para extração e concentração de Cd(II) foi realizada para se obter condições adequadas para a determinação destes analitos nas amostras de leite. Alguns testes iniciais foram feitos com o leite *in natura*, buscando formar o SAB diretamente com amostra de leite. Apesar de ocorrer a separação das fases, a %E obtida não foi satisfatória, porque o leite é uma amostra complexa e a quantidade de caseína presente estava interferindo no processo de particionamento dos íons metálicos. Foram realizadas diversas diluições das amostras de leite, mas não se obteve sucesso na extração. Diante disso, optou-se por remover a caseína do leite, por meio da adição de 1,0 mL de ácido nítrico concentrado. Testes de adição e recuperação foram realizados e verificou-se que o analito de interesse não ficava retido na fração proteica que é precipitada e separada após adição do ácido. Desta forma, adotou-se esse procedimento de pré-tratamento simplificado para viabilizar o método proposto.

2.4.2. Efeito da Quantidade de Agente Extrator

A **Figura 2.1** ilustra a eficiência de extração de íons Cd(II) em função da quantidade de íons iodeto como agente extrator adicionado no sistema aquoso bifásico PEG(1500) + Na₂SO₄ + água a temperatura de 25°C. De acordo com a Figura 2.1, na ausência do extrator iodeto, o íon metálico é extraído de forma insignificante (%E = 2,4 ± 0,4%) para a fase rica em polímero (fase superior), permanecendo preferencialmente na fase rica em sal (fase inferior) do sistema de extração. Contudo, na presença do agente extrator iodeto, a uma razão

molar ((mol I⁻) / (mol Cd(II))) igual a 2000, ocorre uma extração máxima de íons cádmio de 98,8 ± 0,4%.

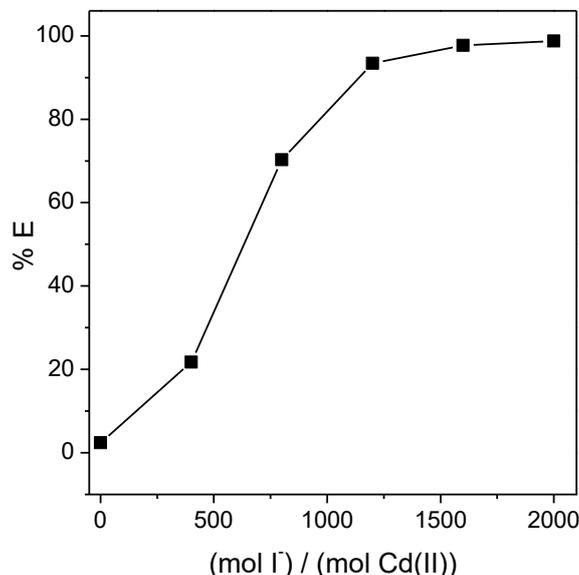


Figura 2.1. Efeito da concentração de extrator iodeto na porcentagem de extração (%E) de Cd²⁺ utilizando PEO1500 + Na₂SO₄ + H₂O CLA 32,28%(m/m) (■) (n = 6).

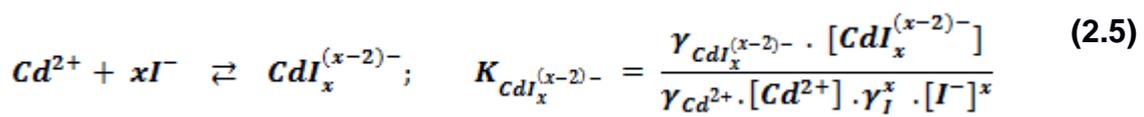
Na ausência de agente extrator, o íon metálico é complexado preferencialmente pelo ânion do sal formador do sistema, de acordo com as **Equações 2.3 e 2.4**. Este comportamento já foi relatado na literatura em outros trabalhos envolvendo a extração de íons metálicos em SAB (Bulgariu & Bulgariu, 2008; Bulgariu & Bulgariu, 2013; Rodrigues et al., 2008). Isto sugere que a concentração dos íons Cd(II) na FI se deve às interações entre os cátions metálicos com os ânions sulfato promovendo a formação de complexos. Dessa forma, o cádmio é complexado pelo sulfato presente na fase rica em sal, de acordo com o equilíbrio:



$$K_{\text{Cd}(\text{SO}_4)_x^{(2x-2)-}} = \frac{\gamma_{\text{Cd}(\text{SO}_4)_x^{(2x-2)-}} \cdot [\text{Cd}(\text{SO}_4)_x^{(2x-2y)}]}{\gamma_{\text{Cd}^{2+}} \cdot [\text{Cd}^{2+}] \cdot \gamma_{\text{SO}_4^{2-}}^x \cdot [\text{SO}_4^{2-}]^x} \quad (2.4)$$

onde, $K_{Cd(SO_4)_x}^{(2x-2y)}$ é a constante termodinâmica de formação do complexo cádmio-sulfato; γ_i é o coeficiente de atividade de espécies iônicas "i".

Com a adição de iodeto ao sistema, ocorre uma competição entre os ânions sulfato e iodeto pela complexação do cádmio, conforme mostrado na **Equação 2.5**. Assim, a constante de estabilidade (K) é dependente da estrutura eletrônica do íon metálico central. Quanto maior o valor de K, maior a estabilidade termodinâmica do complexo cádmio-sulfato. Logo, a eficiência de extração do metal será inversamente proporcional à constante de formação do complexo quando considerado apenas a interação cádmio-sulfato. Os valores das constantes de formação dos complexos cádmio-sulfato e cádmio-iodeto (expressos em log K) são $\log K_{Cd-sulfato} = 2,31$, $\log K_{Cd-iodeto} = 6,10$, respectivamente (Lurie, 1975). Dessa forma, o complexo Cd-iodeto é favorecido e este complexo é particionado preferencialmente para a FS do SAB, processo este ilustrado pela **Equação 2.5**:



onde $K_{CdI_x^{(x-2)-}}$ é a constante termodinâmica de formação do complexo cádmio-iodeto; γ_i é o coeficiente de atividade da espécie iônica "i"; $[i]$ é a concentração da espécie iônica "i" ($i = Cd^{2+}, I^-, CdI_2^-$). Com base nestas observações, pode-se afirmar que a extração de íons cádmio na presença do extrator iodeto, em sistemas aquosos bifásicos, ocorre devido à competição entre o extrator iodeto e os ânions sulfato pelos íons cádmio presentes na fase rica em sal. Os íons Cd(II), inicialmente presentes na fase rica em sal como complexos cádmio-sulfatos, irão interagir com o agente extrator e as espécies formadas ($CdI_n^{(n-2)-}$) serão particionadas na fase rica em polímero (Bulgariu & Bulgariu, 2013).

De acordo com a literatura (Bulgariu & Bulgariu, 2006; 2008a; 2008b) a quantidade de extrator iodeto de espécies extraídas depende das espécies iônicas de cádmio e das condições experimentais. Isso porque a formação de espécies ($CdI_n^{(n-2)-}$) ocorre passo a passo, a partir da fase rica em sal. A

formação dessas espécies continua na interface, até o seu grau de hidratação tornar-se compatível com o ambiente de hidratação da fase rica em polímero do sistema de extração (PEO1500 + Na₂SO₄ + água). Quando esta condição é satisfeita, o complexo cádmio-iodeto é transferido espontaneamente para a fase rica em polímero e uma extração quantitativa é assegurada pelo excesso de iodeto (Bulgariu & Bulgariu, 2013). Isso explica o comportamento da **Figura 2.1**, onde se pode verificar que o aumento da extração ocorreu com o aumento gradativo da quantidade de iodeto adicionada ao sistema.

Quando foi utilizada uma proporção (mol de I⁻) / (mol de Cd²⁺) superior a 500 já se obteve uma %E maior que 50%, atingindo um máximo de %E de 98,8% em uma proporção (mol de I⁻) / (mol de Cd²⁺) de 2000. Isso porque, a concentração de espécies $CdI_n^{(n-2)-}$ aumenta na fase rica em polímero e reduz na fase rica em sal, deslocando o equilíbrio (**Equação 2.5**) no sentido de formar outras espécies de complexo cádmio-iodeto, que irão interagir com outros íons iodeto na interface, sendo então, transferidos para a fase rica em PEO. Resultados semelhantes têm sido encontrados na literatura (Lacerda et al., 2009; Rogers et al., 1996; Shibukawa et al., 2001), onde a utilização de íons de iodeto como agentes extratores permitem a partição preferencial de íons cádmio, em sistemas aquosos bifásicos (PEO1500 + Na₂SO₄ + água).

2.4.3. Efeito do Eletrólito na Extração de Cd(II) no SAB

A **Figura 2.2** mostra o efeito do eletrólito na extração de íons Cd(II). Esse estudo foi realizado com os SABs formados de PEO1500 e Na₂SO₄, PEO1500 e Na₃C₆H₅O₇, PEO1500 e Na₂C₄H₄O₆ todos na presença do agente extrator iodeto. Os resultados desse estudo podem ser verificados na Tabela 2.1. Comparando esses resultados, pode-se perceber que os valores de %E para os íons Cd(II) em PEO1500 + Na₃C₆H₅O₇ + água, PEO1500 + Na₂C₄H₄O₆ + água e sistemas PEO1500 + Na₂SO₄ + água são, 78,3%, 49,9% e 110,6% para a proporção (mol de I⁻) / (mol de Cd²⁺) igual a 2000, respectivamente.

Quando quantidades iguais de iodeto são adicionadas, maiores valores de %E são obtidos para SAB que contêm Na₂SO₄ do que aqueles que contêm Na₃C₆H₅O₇ e Na₂C₄H₄O₆. Por exemplo, a uma proporção (mol de I⁻) / (mol de

Cd^{2+}) igual 1600 a %E de íons $\text{Cd}(\text{II})$ extraídos na fase superior é de $(104,0 \pm 0,4)\%$, $(57,5 \pm 0,6)\%$, $(59 \pm 3)\%$, utilizando os sistemas com sulfato de sódio, citrato de sódio e tartarato de sódio, respectivamente, como pode ser verificado na **Figura 2.2**. O efeito do sal está relacionado com a capacidade do ânion em complexar o cádmio na fase inferior. Ao se analisar a **Figura 2.2** percebe-se que o sulfato complexa menos os íons $\text{Cd}(\text{II})$ que os ânions citrato e tartarato.

O bom desempenho do sulfato pode ser conferido à interação menos intensa entre este ânion e os íons cádmio. Isso pode ser explicado pela diferença entre os valores das constantes de formação (expressos em $\log K$) da interação entre o ânion do eletrólito utilizado e os íons $\text{Cd}(\text{II})$ presentes na solução ($\log K_{\text{sulfato de sódio}} = 2,3$, $\log K_{\text{citrato de sódio}} = 2,6$ e $\log K_{\text{tartarato de sódio}} = 2,9$ (Lurie, 1975), confirmando o fato descrito anteriormente. Isso porque quanto maior o valor de $\log K$ dos complexos formados, maior será a competição entre a formação do complexo Cd-SO_4 e a do complexo $\text{Cd}(\text{II})$ -iodeto, conseqüentemente, menor a quantidade de íons $\text{Cd}(\text{II})$ que será particionado para fase polimérica. Assim, o sulfato de sódio foi escolhido como melhor eletrólito no sistema aquoso bifásico PEO1500 e água, usando o agente extrator iodeto, como pode verificado na **Figura 2.2**.

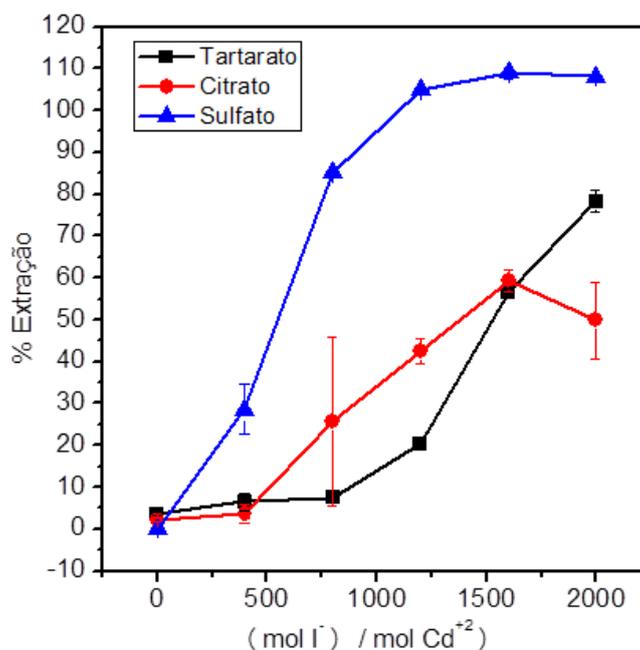


Figura 2.2. Efeito do eletrólito na extração de íons $\text{Cd}(\text{II})$ utilizando PEO1500 + $\text{Na}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}$ (\blacktriangle), PEO1500 + $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 + \text{H}_2\text{O}$ (\blacksquare) e PEO1500 + $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 + \text{H}_2\text{O}$ (\bullet), $T = 25^\circ\text{C}$, ($n=6$).

2.4.5. Influência do Comprimento da Linha de Amarração

Outro parâmetro importante em estudos de extração de sistema aquoso bifásico é o comprimento da linha de amarração (CLA). Este parâmetro termodinâmico expressa a diferença nas propriedades termodinâmicas intensivas entre as fases superior e inferior a uma determinada pressão e temperatura constante (Da Silva et al., 2010).

O CLA é expresso pelas diferenças entre as concentrações de polímero e de sal presentes em cada fase. Esse parâmetro é comumente utilizado como uma das variáveis que determina o particionamento do soluto no SAB. Quanto maior o valor do CLA, mais distintas são as propriedades termodinâmicas intensivas entre as fases. O cálculo do CLA é feito com a **Equação (2.6)**,

$$CLA = [(C_P^S - C_P^I)^2 + (C_S^S - C_S^I)^2]^{1/2} \quad (2.6)$$

onde C_P^S e C_P^I são as concentrações de polímero e C_S^S e C_S^I são as concentrações do sal % (m/m) nas fases superior e inferior, respectivamente.

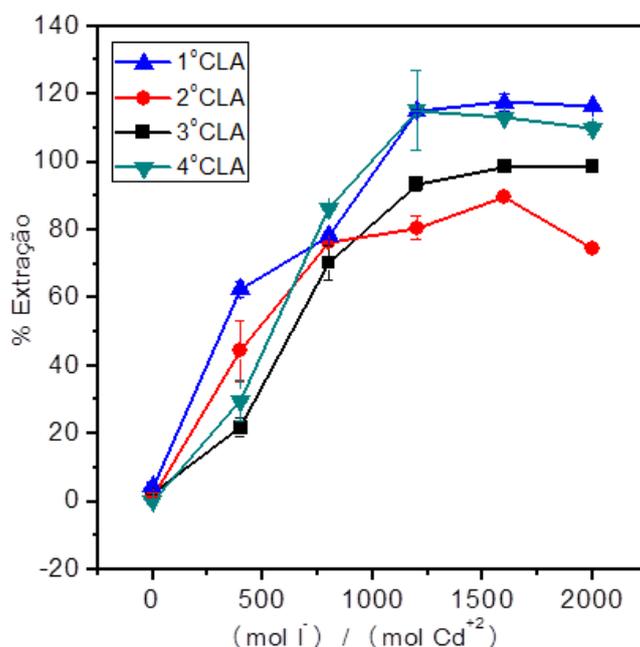


Figura 2.3. Efeito do comprimento da linha de amarração (CLA) na %E de Cd(II) utilizando o sistema PEO 1500+ Na₂SO₄ + H₂O (CLA = 32,28%) (▲), PEO 1500+ Na₂SO₄ + H₂O (CLA = 35,94%) (●), PEO 1500+ Na₂SO₄ + H₂O (CLA = 40,10%) (■) e PEO 1500+ Na₂SO₄ + H₂O (CLA = 46,97%) (▼), T = 25°C, (n=6).

A utilização do primeiro CLA 32,28% reduz o custo do sistema, pois quanto menor o CLA menor a quantidade dos reagentes utilizados na construção do SAB. Isso porque, a composição global de cada fase é menor e o volume de água utilizado na construção desse tipo de sistema é maior.

2.4.5. Efeito do Peso Molecular do Polímero

A **Figura 2.4** mostra o efeito do peso molecular do polímero na composição do sistema aquoso bifásico (PEO + Na₂SO₄ + água) utilizado na extração de íons Cd(II), quando se adiciona concentrações diferentes de extrator iodeto. É possível observar, na **Figura 2.4**, que não houve diferença significativa entre os percentuais de extração dos polímeros PEO1500 (103,8%) e PEO400 (98,8%), enquanto que o PEO6000 apresentou um menor percentual de extração (45,4%). Isso ocorre provavelmente porque o complexo cádmio-iodeto é de caráter aniônico, logo, interage preferencialmente com polímeros de massa molecular menor que são mais hidrofílicos. Já o PEO 6000, interage fracamente com o complexo cádmio-iodeto, porque aumenta a hidrofobicidade da FS, resultando em um menor %E de íons Cd(II) (45,4%).

Trabalhos realizados por Da Silva et al.,(2008), mostraram que o efeito da hidrofobicidade da fase rica em polímero (FS) sobre a partição de íons é muito alta. Por exemplo, a partição do [Fe (CN)₅(NO)]²⁻ e [Fe (CN)₆]³⁻ é influenciada pelo aumento da hidrofobicidade.

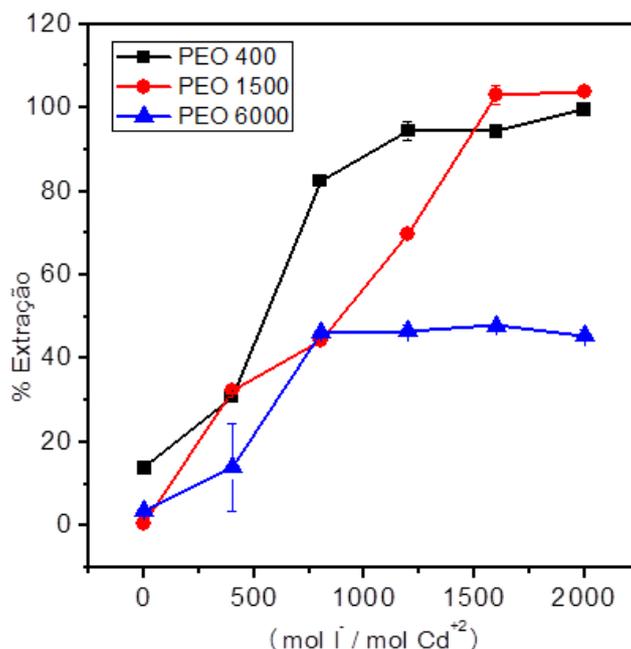


Figura 2.4. Efeito da natureza do polímero e da $[I^-]$ utilizando os sistemas formados por PEO400 + Na₂SO₄ + H₂O (CLA 45,69%(m/m)) (■), PEO1500 + Na₂SO₄ + H₂O (CLA 46,97%(m/m)) (●) e PEO6000 + Na₂SO₄ + H₂O (CLA 45,05%(m/m)) (▲), (n=6).

Com base nos resultados da **Figura 2.4**, o PEO400 poderia ser escolhido para compor o sistema aquoso bifásico constituído por PEO400, Na₂SO₄ e água com extrator iodeto que apresentaria praticamente os mesmos %E (98,8%) de íons Cd(II) que o PEO1500 (103,8%). Porém, foi escolhido o PEO1500 para os demais testes de otimização por apresentar um menor custo de mercado.

2.4.6. Razão Mássica

A **Figura 2.5** mostra a influência da razão da massa entre a fase superior e a inferior (M_{FS}/M_{FI}) sobre a eficiência de extração de íons Cd(II) no sistema aquoso bifásico PEO1500 – Na₂SO₄ - água na presença do extrator iodeto. Os resultados experimentais indicam que os valores de %E de íons cádmio são pouco influenciados pela mudança na razão entre as massas das fases inferior (rica em sal) e superior (rica em polímero). Isso pode ser verificado na **Figura 2.5**, em que as razões de 0,5, 0,75 e 1 geraram máximas %E de 109,8%, 104,8% e 98,8%, respectivamente, com concentração de

iodeto de 280 mmol kg^{-1} . Dessa forma, os resultados obtidos no estudo da razão mássica sugerem que o %E de cádmio é pouco afetado por alterações na composição global, ao longo da mesma linha de amarração.

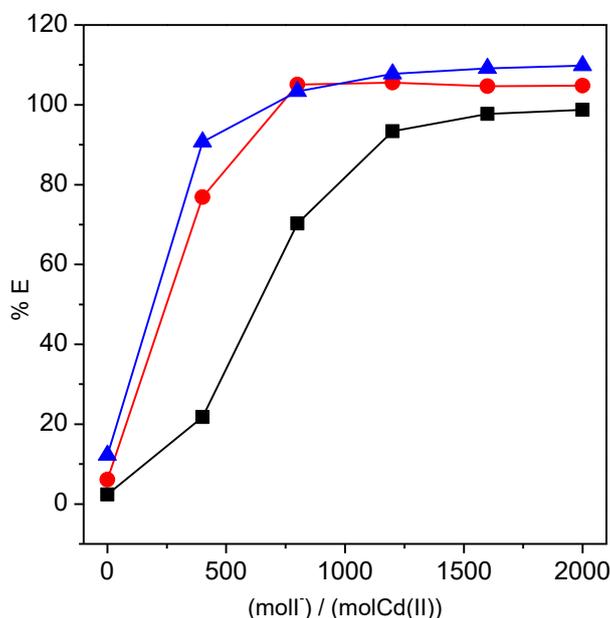


Figura 2.5. Efeito da razão mássica entre FS e a FI na %E de Cd(II) utilizando o sistema formado por PEO1500+Na₂SO₄+H₂O CLA = 32,28%(m/m) para as M_{FS}/M_{FI} = 0,75 (●); 1,0 (■) e 0,5 (▲), (n=6).

2.4.7. Figuras de Mérito

Após a otimização das condições experimentais, foram obtidas as figuras de mérito (**Tabela 2.2**), por meio do processo de validação. Esta foi iniciada com o estudo da linearidade e para isso foi construída uma curva de calibração com seis níveis de concentrações de cádmio com valores de 0, 25, 50, 75, 100, 125 e 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$ com três replicatas independentes que foram lidas aleatoriamente. As premissas de que os resíduos da regressão seguem a distribuição normal, são homoscedásticos e independentes foram confirmados, garantindo uma aplicação segura dos testes de hipóteses de t e F, além do emprego adequado do MMQO, sem ponderações. Dois valores extremos (*outliers*) para os níveis 100 e 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$ foram confirmados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife.

A premissa de que os resíduos da regressão devem seguir a distribuição normal foi confirmada pelo teste de Ryan-Joiner, com coeficiente de correlação de 0,9789 e valor crítico de 0,9483. Estes resultados indicaram que o desvio da

normalidade não foi significativo ($p > 0,10$). A variabilidade dos resíduos ao longo das concentrações estudadas foi constante, uma vez que as estatísticas de Levene, estimadas em 0,128 para a curva matrizada (com t crítico de 2,101), não foram significativas ($p > 0,05$).

Foi verificada independência dos resíduos da regressão aplicando os cálculos das estatísticas de Durbin-Watson, indicando que não houve autocorrelação ($p > 0,10$). A ratificação destas duas premissas (homoscedasticidade e independência) indicou adequação do uso do MMQO, sem ponderações, para estimativa dos parâmetros da regressão. As médias das recuperações alcançadas para as seis replicatas de amostras foram de 101% para $25 \mu\text{g kg}^{-1}$, 98,5 para $75 \mu\text{g kg}^{-1}$ e 102% para $125 \mu\text{g kg}^{-1}$, atendendo aos critérios de aceitabilidade da legislação brasileira (MAPA, 2011) que são de 70% a 110%. Estes resultados demonstram que a recuperação do método é adequada nos níveis estudados.

Para precisão em termos de repetibilidade, os valores de DPR variaram de 4,35 a 7,65 na faixa de concentração estudada, sendo considerados aceitáveis, pois são menores que 20% (critério de aceitabilidade do órgão fiscalizador (MAPA, 2011), indicando que o método apresenta uma boa precisão.

O limite de detecção foi calculado com base no Guia do MAPA (MAPA, 2011) para um nível de confiança de 95% utilizando a equação $X \pm t_{sb}$, onde X é a média das concentrações das amostras, t é o teste t de student e S_b é o desvio padrão de dez replicatas do branco. Também foi calculado o limite de quantificação usando a equação $X \pm 10.s_b$. Todos esses resultados podem ser verificados na **Tabela 2.2**.

Tabela 2.2. Figuras de mérito.

Parâmetros	Valores ou faixa de valores
Faixa Linear ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	6,9 – 150
Limite de detecção, LD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	2,3
Limite de quantificação, LQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	6,9
Equação da curva de calibração	$y = (2,0 \times 10^{-4} X \pm 1,0 \times 10^{-5}) + (5,3 \times 10^{-3} \pm 4,0 \times 10^{-4})$
Coeficiente de determinação	$R^2 = 0,9901$
Precisão, DPR (%)	5,5 – 7,6
Recuperação (25 a $125 \mu\text{g kg}^{-1}$; %)	98,5 – 102

Para avaliação da recuperação em amostras com diferentes características fortificou-se as amostras de leite desnatado, leite pasteurizado, leite zero lactose e leite fortificado com ferro foram fortificadas com $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ de Cd(II). Foram obtidas recuperações de $99 \pm 6\%$, $106 \pm 1\%$, $95,2 \pm 0,6\%$, $108,9 \pm 0,4\%$ e $81,5 \pm 1\%$, respectivamente (**Tabela 2.3**). De acordo com EC (2002), se forem obtidos valores de recuperação de 80 a 110% para fração massa de amostra maior ou igual a $10 \mu\text{g kg}^{-1}$, não há falta de exatidão do método. Com base nisso, pode-se afirmar que o método é exato ao se observar os resultados na **Tabela 2.3**.

Tabela 2.3. Concentração de cádmio nas diferentes amostras de leite bovino.

Amostras	[Cd ²⁺] adicionada	Valor Recuperado	Recuperação %	CV %
Leite integral	75,0	74 ± 6	99	2
Leite desnatado	55,0	$58,5 \pm 1$	106,4	1,7
Leite pasteurizado	55,6	53 ± 1	95,2	1,1
Leite zero lactose	54,3	$59,2 \pm 0,4$	108,9	0,7
Leite fortificado c/ Fe	66,3	54 ± 1	81,5	1,8

A única amostra que não se obteve um valor de recuperação próximo de 100% foi a amostra de leite fortificado com ferro. A explicação mais coerente é que os íons ferro podem estar concorrendo com o cádmio no momento da complexação com o iodeto e ocorrendo uma atenuação do sinal analítico.

2.5. Conclusão

Neste trabalho, foi otimizado e validado um novo método para a extração e determinação de íons Cd(II) em amostras de leite bovino, utilizando sistema aquoso bifásico como técnica de extração e detecção por espectrometria de absorção atômica por chama. Dessa forma, foi eliminada a etapa de digestão, geralmente utilizada quando se trabalha com matriz complexa como o leite. O melhor sistema foi PEO1500 + Na₂SO₄ + água foi aplicado para a extração seletiva dos íons Cd(II) utilizando o agente extrator iodeto.

A eficiência da extração desse metal foi afetada fortemente pelos seguintes parâmetros: quantidade de agente extrator adicionado, tipo de eletrólito, mas não foi afetada significativamente pelo comprimento da linha de amarração (escolheu-se o primeiro CLA 32,28%) e nem pela razão mássica das fases. Na ausência de iodeto, o Cd(II) permaneceu na fase rica em eletrólito, obtendo-se os valores de %E inferior a 0,6%. Com a adição de iodeto, o Cd(II) foi extraído quantitativamente para a fase superior do SAB, com um máximo de %E de $(103,4 \pm 0,4\%)$.

O sistema aquoso bifásico desenvolvido apresentou linearidade na faixa estudada, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e precisão satisfatórios. Além disso, o método é simples, rápido, economicamente viável, ambientalmente amigável e está de acordo com os princípios da Química Verde.

Capítulo 3

ANÁLISE MULTIELEMENTAR DE VINHO TINTO USANDO FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X POR REFLEXÃO TOTAL

CAPÍTULO 3: ANÁLISE MULTIELEMENTAR DE VINHO TINTO USANDO FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X POR REFLEXÃO TOTAL

3.1. INTRODUÇÃO

O vinho é uma bebida amplamente consumida no mundo há séculos, tendo grande valor comercial e importância social. Há duas fontes principais que contribuem para a presença de elementos inorgânicos em vinho. Uma natural relacionada com a composição do solo da plantação de uva que entra no sistema radicular da planta recebendo a maior parte dos íons presentes no vinho. Em segundo lugar, temos as fontes antrópicas, como a poluição de indústrias vizinhas, fertilizantes e pesticidas que podem ser introduzidos durante todo o processo de vinificação, desde o crescimento da uva até colheita e produção do vinho (aplicação de aditivos, maquinaria e outras operações) (Pyrzynska, 2004; Pessanha et al., 2010).

Os métodos oficiais para a determinação desses elementos em vinho recomendados pela Organização Internacional do Vinho (OIV) e pela Sociedade Americana de Enologistas (ASN) são essencialmente baseados em espectrometria de absorção atômica (AAS) devido à sua seletividade, alta sensibilidade e capacidade para medições diretas (Pyrzynska, 2004). Outra possibilidade é a utilização da espectrometria de fluorescência de raios - X por reflexão total (TXRF). Esta técnica analítica é bem estabelecida para a determinação de vários elementos em diversos tipos de amostras (Cinosi et al., 2011; Dalipi et al., 2016; Borgese et al., 2015, 2018).

Essa técnica apresenta algumas vantagens em relação a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), tais como, a utilização de pequena quantidade de amostra necessária para realizar a análise, não consome gases e a possibilidade de obter resultados quantitativos sem calibração externa. Geralmente, a análise quantitativa de amostras de vinho por técnicas ICP implica no uso de soluções-padrão. Além disso, é necessária uma etapa de digestão da amostra antes das análises por ICP-MS, procedimento que é desnecessário TXRF (Borgese et al., 2015; BRUKER, 2012; Selih et al., 2014).

No caso do TXRF, a quantificação pode ser realizada diretamente utilizando-se a padronização interna e, portanto, o procedimento de quantificação é mais rápido e fácil. Além disso, essa técnica não requer sistema de refrigeração ou consumo de gás para operação, a análise também é mais econômica em comparação com outras técnicas de espectroscopia atômica (Anjos et al., 2003; Carvalho, 1996; Galani-Nikolakaki, 2002; Gruber et al., 2006; Haswell & Walmsley, 1998).

Na literatura há vários trabalhos utilizando TXRF na análise de amostras de vinhos tintos (Anjos et al., 2003; Dalipi et al., 2016; Galani-Nikolakaki, 2002; Gruber et al., 2006; Pessanha et al., 2010). A maioria das contribuições publicadas até agora sobre a análise desse tipo de amostra utilizando a TXRF foi realizada usando pequenas quantidades de amostras (< 28) de diferentes países. Nesse trabalho foram analisadas 70 amostras de vinhos de diferentes países e diferentes tipos de uvas, mostrando as potencialidades da Fluorescência de Raios-X por Reflexão Total na análise de rotina para esse tipo de bebida.

3.2. OBJETIVOS

3.2.1. Geral

Desenvolver um método rápido, simples e com exatidão aceitável para determinação multielementar dos constituintes inorgânicos de amostras de vinho tinto usando como técnica de quantificação a TXRF.

3.2.2. Específicos

- i. Coletar amostras de vinho tinto de diversos países;
- ii. Otimizar e validar o método desenvolvido;
- iii. Determinar a precisão e exatidão do método desenvolvido usando o método de adição de padrão;
- iv. Aplicar o método validado na análise de diferentes amostras de vinho tinto.

3.3. EXPERIMENTAL

3.3.1. Instrumentação

As determinações das concentrações dos constituintes inorgânicos nas amostras de vinho tinto foram realizadas usando um espectrômetro portátil de fluorescência de raios - X por reflexão total, S2 PICOFOX™ de bancada (Bruker Nano GmbH, Karlsruhe, Alemanha). Esse espectrômetro TXRF é equipado com um tubo de Mo - K α 17,5 keV, uma fonte de excitação de 600 μ A, 50 kV, 50 W, um monocromador multicamada e um detector de derivado de silício (SDD) com uma área ativa de 10 mm². A resolução do detector era maior do que 160V e 10 Kpcs (Mn K α). O tubo de raios - X tem proteção primária contra radiação feita de 5 mm de bronze e uma fina janela de berílio (100 μ m) pela qual os raios - X escapam para o exterior. Na direção do monocromador, é fornecida uma abertura de 3 mm para a emissão do feixe útil. A modelagem do feixe é realizada por meio de um sistema de abertura e resulta em uma forma de feixe na área de amostra de cerca de 7 x 0,1 mm². A monocromatização da radiação do tubo é feita através da reflexão de Bragg em uma multicamada. Esta é construída por camadas alternadas de elementos leves e pesados ou seus compostos.

3.3.2. Reagentes e Materiais

Todos os reagentes utilizados foram de grau de analítico. Como padrão interno foram utilizadas soluções padrão de ítrio (Y), gálio (Ga) e germânio (Ge) com concentrações de 1000 mg L⁻¹ (Fluka Analytical, Buchs, Suíça). Também foram utilizadas soluções padrão de chumbo (Pb) e arsênio (As) (Fluka Analytical, Buchs, Suíça) com concentrações de 1000 mg L⁻¹ para preparar as amostras fortificadas.

Foram utilizados discos de quartzo de 30 mm de diâmetro e uma espessura de 3,0 \pm 0,1 mm como porta-amostra. Para limpeza e hidrofobização dos discos de quartzo (porta-amostras) foram utilizados detergente não iônico RBS (Sigma-Aldrich, EUA), acetona pura - C₃H₆O PA (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e solução de silicone em isopropanol (Serva™, Heidelberg, Alemanha).

Esse procedimento é importante para evitar a propagação da microgota da amostra no momento de sua deposição no porta-amostra que pode influenciar nos resultados da análise.

As soluções foram preparadas com água deionizada ultrapura obtida em um sistema de purificação de água Milli-Q, modelo Direct-Q 3, Water Purification System (Millipore, EUA) com resistividade 18,2 MΩ cm.

3.3.3. Coleta e Preparação de Amostras

Setenta amostras de vinho tinto foram adquiridas em mercados de cinco estados brasileiros (Minas Gerais, Bahia, Rio Grande do Sul, Espírito Santo e Santa Catarina). As amostras são de diversas nacionalidades (Brasil, Chile, Uruguai, Argentina, Itália, Estados Unidos, França, Portugal, Espanha, Austrália e África do Sul) e produzidas a partir de diferentes tipos de uva como Camernere, Syrah, Cabernet Sauvignon, Malbec, Merlot e mistura de uvas (blend).

3.3.4. Otimização do Método

O método foi desenvolvido para a quantificação direta dos constituintes inorgânicos (P, S, Cl, K, Ca, V, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Br, Sr, Ba e Pb) presentes em vinhos tintos de diferentes tipos de uva usando TXRF. Para otimizar o método foi escolhida, aleatoriamente, uma amostra composta por mistura de uvas americanas. As variáveis otimizadas foram o padrão interno (Ga, Y, Ge) e sua concentração (1 e 10 mg L⁻¹), o tempo de medição (100 s, 250 s, 500 s e 1000 s), a diluição das amostras (2x e 1,33x), o modo de secagem das amostras (estufa à 35°C e 50°C, vácuo e lâmpada infravermelho) num tempo de 10 minutos. Esse tempo foi fixado após verificar visualmente, a cada um minuto, que o disco contendo a amostra não secava, fato que se concretizou no décimo minuto.

Para se obter a melhor condição de trabalho uma alíquota de 50,00 mL da amostra de vinho tinto (mistura de uvas americanas) foi fortificada com 150 µg L⁻¹ de Pb e 200 µg L⁻¹ de As, de acordo com as concentrações

estabelecidas pela legislação (ANVISA, 2013; MAPA, 2010; OIV, 2011). A partir dessa amostra foi realizada a otimização do método.

Para avaliar o tempo de aquisição do sinal analítico uma alíquota de 900 μL da amostra de vinho fortificada foi adicionada a um tubo de microcentrífuga de polietileno (Eppendorf, São Paulo, SP) com capacidade para 1,5 mL, contendo 100 μL de solução de padrão interno Ga na concentração de 10 mg L^{-1} resultando numa concentração final de 1 mg L^{-1} . Essa solução foi homogeneizada usando um dispositivo Vortex. Esse procedimento foi realizado em triplicata. Foi utilizada uma pipeta automática para adicionar 5 μL dessa amostra nos discos de quartzo que foram secos, formando um filme muito fino da amostra, em lâmpada de infravermelho. Após resfriarem à temperatura ambiente esses discos foram analisados diretamente no espectrômetro TXRF, variando o tempo de leitura de 100 a 1000 segundos. O processamento dos espectros de raios-X e a contabilização de sobreposições de picos de fluorescência foram realizados utilizando o software SPECTRA versão 7.0 (Bruker Nano GmbH, Karlsruhe, Alemanha).

Em seguida, foi avaliada a diluição das amostras de vinho (2x e 1,33x). Esse procedimento teve início com a adição de uma alíquota de 500 μL da amostra fortificada em um tubo de microcentrífuga contendo 100 μL de solução de padrão interno (PI) Ga na concentração de 10 mg L^{-1} e concentração final de 1 mg L^{-1} e completado para o volume final de 1000 μL com água deionizada. Em outro momento, esse mesmo procedimento foi realizado utilizando o volume de amostra de 750 μL , 100 μL de PI Ga (10 mg L^{-1}) e concentração final de 1 mg L^{-1} e completado para o volume final de 1000 μL com água deionizada. A solução resultante foi homogeneizada, 5 μL da mesma foram depositados no disco de quartzo e seca em lâmpada de infravermelho. O procedimento foi realizado em triplicata e esses discos, contendo um filme muito fino da amostra, foram analisados no espectrômetro TXRF, com o tempo de leitura de 500 segundos.

O próximo passo foi avaliar o tipo de padrão interno (Ga, Y, Ge) e sua concentração (1 e 10 mg L^{-1}). Para isso foi adicionado uma alíquota de 750 μL da amostra fortificada em um tubo de microcentrífuga contendo 100 μL de solução de Ga na concentração de 10 mg L^{-1} e concentração final de 1 mg L^{-1} e completado para o volume final de 1000 μL com água deionizada. Em outro

tubo de microcentrífuga foi repetido o mesmo volume de amostra, mas agora foi adicionando 100 μL de Ga 10 mg L^{-1} e completado para o volume final de 1000 μL com água deionizada, resultando em uma concentração final de Ga 10 mg L^{-1} . A solução resultante foi homogeneizada, o procedimento foi realizado em triplicata como já descrito anteriormente e a amostra depositada nos discos de quartzo foi analisada no espectrômetro TXRF, com o tempo de leitura de 500 segundos. O mesmo procedimento foi repetido para os elementos Y e Ge. e os discos de quartzo foram analisados no espectrômetro TXRF, com o tempo de leitura de 500 segundos. O mesmo procedimento foi repetido para os elementos Y e Ge.

Posteriormente foi avaliado o modo de secagem dos discos de quartzo em estufa a 35 e 50°C por um tempo de 10 minutos. Os resultados obtidos foram comparados com os dos discos secos em lâmpada de infravermelho aplicando os testes comparativos F e t.

3.3.5. Validação do Método

Não é feita avaliação da linearidade, uma vez que não se trabalha com curva de calibração na técnica de TXRF. Para avaliar a precisão e a exatidão do método, a amostra de vinho tinto foi fortificada com alíquotas de soluções de Cu, Mn, Br, Sr, V, Fe, Ni e Ba na concentração de 1,0 mg L^{-1} , solução de Zn (5,0 mg L^{-1}), As (0,2 mg L^{-1}) e Pb (0,15 mg L^{-1}), preparadas a partir de soluções padrão de 1000 mg L^{-1} . O volume final foi de 10,0 mL. Posteriormente, retirou-se uma alíquota de 750 μL dessa amostra e adicionou-se a um tubo de microcentrífuga contendo 100 μL de padrão interno Ga 10 mg L^{-1} e completando o volume para 1,0 mL com água deionizada. A partir dessa amostra foram preparados os porta-amostras seguindo os mesmos procedimentos já descritos anteriormente. Em seguida eles foram secos em lâmpada infravermelho com tempo de 5 minutos e analisados no TXRF usando tempo de leitura de 500s.

O tratamento estatístico a um nível de confiança de 95% foi aplicado a todos os testes para verificar se havia diferença significativa entre os valores das variáveis estudadas.

3.3.6. Análise das Amostras de Vinho por TXRF

Após estabelecer as melhores condições do método e validá-lo, foram adicionados 100 µL de Ga 10 mg L⁻¹ (concentração final 1 mg L⁻¹) em 750 µL de amostras de vinho e 150 µL de água desionizada. A solução resultante foi homogeneizada e uma alíquota de 5 µL foi transferida para um porta-amostra de vidro de quartzo e seca em lâmpada de infra-vermelho durante 5 min. As amostras foram preparadas em triplicata e elas formavam filmes finos e circulares nos porta-amostras após secagem, ficando apropriadas para análises de TXRF. O tempo de aquisição de dados foi de 500 s para cada amostra. Foram analisadas 70 amostras de vinhos para a quantificação de P, S, Cl, K, Ca, Mn, V, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Br, Rb, Sr, Ba e Pb.

3.4. Resultados e discussão

3.4.1. Otimização do método

3.4.1.1. Avaliação do Padrão Interno

A avaliação do padrão interno foi realizada pela adição de uma quantidade definida de solução padrão monoelementar. A concentração desse padrão interno depende da concentração dos elementos na amostra. O elemento selecionado como PI não deve estar presente na amostra, e as linhas de fluorescência dele não devem interferir com as dos elementos de interesse na amostra. Assim, avaliou-se a influência de Ga, Y e Ge como padrão interno em duas concentrações: 1,0 e 10 mg L⁻¹. Foram obtidos melhores resultados para Pb e As (101 ± 2% e 97 ± 1%, respectivamente) quando Ga foi utilizado como PI na concentração de 1,0 mg L⁻¹ (**Tabela 3.1**). Quando foram utilizados Ga 10 mg L⁻¹, foram encontradas baixas recuperações, devido às interferências espectrais causadas pelo alargamento do pico de Ga (Kα1 = 10,26 keV) que está próximo do Pb (Lα2 = 10,44 keV) e As (Kα1 = 10,54 keV). O uso de Ge 1,0 mg L⁻¹ e 10,0 mg L⁻¹ como PI apresentaram porcentagens de recuperação superestimadas, enquanto Y nas concentrações de 1,0 10,0 mg L⁻¹ apresentaram valores de recuperação subestimados. Portanto, o Ga na

concentração de 1,0 mg L⁻¹ foi o padrão interno escolhido para os experimentos posteriores.

Tabela 3.1. Resultados experimentais para avaliação de padrões internos (Ga, Y e Ge) nas amostras de vinho tinto fortificadas com Pb e As, 200 e 100 µg L⁻¹, respectivamente, (n = 3). Tempo de aquisição do sinal = 500 s.

Elemento	Recuperação (%) Y		Recuperação (%) Ge		Recuperação (%) Ga	
	(1,0 mg L ⁻¹)	(10,0 mg L ⁻¹)	(1,0 mg L ⁻¹)	(10,0 mg L ⁻¹)	(1,0 mg L ⁻¹)	(10,0 mg L ⁻¹)
Pb	182 ± 0,2	64 ± 0,1	165 ± 0,1	196 ± 0,02	101 ± 2	85 ± 1
As	154 ± 0,2	86 ± 0,01	158 ± 0,2	203 ± 0,1	97 ± 1	81 ± 1

3.4.1.2. Avaliação do Tempo de Medição

Maiores tempos de medição resultam em menores limites de detecção (LD). O LD foi determinado usando a **Equação (1)**

$$LLDi = 3 \frac{C_{Ga}}{S_i I_{Ga}} \sqrt{\frac{I_{i,BG}}{t}} \quad (1)$$

onde $I_{i,BG}$ é a intensidade de fundo para o elemento i , I_{Ga} a intensidade do padrão interno (Ga), C_{Ga} é a concentração do padrão interno, S_i a sensibilidade relativa para o elemento i e t o tempo de medição (Anjos et al., 2003).

Esse cálculo é importante para estabelecer o tempo mínimo necessário para obter os limites de quantificação que atendem aos valores da legislação para Pb, As, Cu e Zn, e que são suficientemente baixos para a determinação de outros micro e macroelementos no vinho, como Mn, Ni, Br, etc. Esse limite de quantificação (LQ) foi calculado multiplicando 3,3 do LD pelo fator de diluição (1,33).

Os tempos de medida efetivos (isto é, tempo de integração do sinal analítico) investigados foram: 100, 250, 500, 750 e 1000 s usando Ga como um padrão interno. Os resultados (**Tabela 3.2**) mostraram que o aumento do tempo de medição de 100 s para 1000 s levou a diminuição do LQ em um fator de aproximadamente seis vezes. No entanto, 500 s foram escolhidos para medir

amostras subsequentes, porque este tempo produz resultados satisfatórios e aumentou a frequência de análise por um fator de dois. Além disso, a vida do tubo de raios-X também pode ser prolongada devido ao menor desgaste.

Tabela 3.2 Efeito do tempo de medida nos limites de quantificação (LQ) para os elementos P, S, Cl, K, Ca, Ti, V, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Br, Rb, Sr, Ba e Pb nas amostras de vinho.

Elemento	Tempo de medida (s)				
	100	250	500	750	1000
	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)				
P	10788	6935	5056	4038	3568
S	5908	3779	2752	2190	1931
Cl	3516	2230	1655	1312	1146
K	1606	1005	742	597	518
Ca	1045	654	478	386	338
Ti	483	312	233	189	162
V	40	26	18	13	13
Mn	250	162	123	96	83
Fe	198	127	97	79	66
Ni	140	88	66	53	48
Cu	123	79	61	48	4
Zn	110	70	53	44	35
As	83	53	39	31	26
Br	83	53	40	31	26
Rb	101	61	48	40	35
Sr	123	79	57	48	40
Ba	105	70	53	40	35
Pb	114	70	53	44	40

3.4.1.3. Efeito da diluição da amostra e da forma de secagem

Melhores resultados foram obtidos com as amostras que sofreram uma pequena diluição, apenas 1,33x, pois diluições maiores (2x) não permitiram a determinação de alguns elementos que já estavam em pequenas concentrações, tais como arsênio, chumbo e outros. Também foi realizado um único teste com a diluição de 1,11x, mas o disco contendo a amostra não secou completamente, talvez porque o vinho seja uma amostra complexa com elevado teor de açúcares.

O formato do filme fino e homogêneo, requisito para análise no TXRF, foi melhor obtido utilizando a lâmpada de infravermelho em um tempo de 5 minutos. Na estufa os discos não secaram completamente e apresentaram formatos irregulares. No dessecador os discos contendo amostras de vinho tinto permaneceram por um tempo superior a 1 hora, não secando completamente.

3.4.1.4. Validação do Método

A exatidão do método foi verificada usando o procedimento de adição e padrão. As recuperações e os desvios padrão relativo (DPR%) variaram de 95% a 105% e 1% a 4% (**Tabela 3.3**). Isso significa que o método apresenta precisão e exatidão satisfatórias, sendo adequado para a análise quantitativa dos constituintes inorgânicos do vinho tinto.

Tabela 3.3. Resultados (mg L^{-1}) dos elementos (Cu, Mn, Br, Sr, V, Fe, Ni, Ba, Zn, As e Pb) utilizados para avaliar a exatidão e precisão do método proposto usando o procedimento de adição e recuperação.

Elemento	Valor adicionado, mg L^{-1}	Valor encontrado, mg L^{-1}	Desvio Padrão	Recuperação %	DPR %
Mn	1,0	1,01	0,02	101	2
V	1,0	0,96	0,01	96	1
Fe	1,0	1,04	0,02	104	2
Ni	1,0	1,01	0,03	100	3
Cu	1,0	1,02	0,03	102	3
Zn	5,0	5,01	0,02	100	1
As	0,20	0,20	0,002	100	1
Br	1,0	0,95	0,03	95	3
Sr	1,0	1,05	0,02	105	2
Ba	1,0	1,02	0,02	102	2
Pb	0,15	0,155	0,002	103	4

3.4.2. Aplicação do método proposto para determinação multielementar em amostras de vinho tinto

O método foi aplicado para a determinação de P, S, Cl, K, Ca, Ti, Mn, V, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Br, Rb, Sr, Ba e Pb em 70 amostras de vinho tinto. Os resultados desta análise podem ser verificados na **Tabela 3.4**. A maioria dos resultados está de acordo com as concentrações desses elementos relatados em outros trabalhos na literatura (Dalipi et al., 2016; Pessanha et al., 2010).

A possível explicação para a presença desses elementos nas amostras de vinho analisadas se deve aos fatores ambientais e antropogênicos (Kostic et al., 2010). Como ambientais pode-se citar a geografia (por exemplo, região, relevo, presença de recursos hídricos), clima (temperatura, precipitação, umidade, vento, etc.), tipo e composição do solo e variedade de uvas (Fiket et al., 2011; Kostic et al., 2010). Entre os fatores antropogênicos, os principais impactos estão associados à poluição dos vinhedos (por exemplo, contaminação do solo e qualidade da água de irrigação) (Fernandez-Calvino et al., 2008), práticas de manejo da viticultura, como o uso de conservantes de sementes, pulverizações químicas, fertilizantes (Chaignon et al., 2003; Chopin et al., 2008) e tecnologia e armazenamento de vinhos (Tariba, 2011).

Assim, a contaminação do vinho por elementos traços pode ocorrer em diferentes etapas no cultivo da videira (Al Nasir et al., 2001; La Pera et al.,

2008; Fiket et al., 2011), devido à aplicação de insumos agrícolas. Essa contaminação também pode estar relacionada a vinificação e envelhecimento da bebida (Chaignon et al., 2003), devido ao contato prolongado de vinhos com materiais de equipamento de vinificação (alumínio, latão, vidro, aço inoxidável e madeira, etc.) durante o processo de produção de vinho (Tariba, 2011).

Tabela 3.4. Faixa de concentração (mg L⁻¹) dos elementos quantificados em 70 amostras de vinho tinto (valores mínimos e máximos, média e desvio padrão (DP))

Elemento	Mínimo	Máximo	Média(mg L ⁻¹)	DP
P	8,81	191,4	52,30	41,96
S	3,23	176,9	60,76	37,62
Cl	2,3	976,6	58,69	147,6
K	176,50	1124	622,9	201,9
Ca	0,06	119	42,79	19,40
Ti	0,01	1,85	0,52	0,41
V	<LD*	0,17	0,03	0,04
Mn	0,20	5,32	1,37	0,70
Fe	0,013	17,40	2,92	2,25
Ni	<LD**	0,38	0,03	0,06
Cu	0,02	0,85	0,15	0,15
Zn	0,01	2,28	0,75	0,43
As	<LD*	0,10	0,01	0,01
Br	0,01	1,41	0,18	0,22
Rb	0,06	4,55	2,11	1,23
Sr	<LD**	2,95	0,77	0,49
Ba	<LD*	1,64	0,10	0,26
Pb	<LD*	0,03	0,02	0,01

LD*: 0,01; LD**: 0,02

Entre os analitos estudados apenas, As e Pb são controlados pela legislação brasileira. Os valores encontrados para esses elementos estão abaixo do máximo permitido que é 200 e 150 µg L⁻¹, respectivamente (ANVISA, 2013). Esta legislação também controla o cádmio, mas ele não foi quantificado porque o método desenvolvido não é seletivo para este elemento na presença de uma quantidade elevada de K. Portanto, não é possível confirmar sua presença ou ausência nas amostras de vinho analisadas pelo TXRF. O elemento níquel foi detectado em algumas amostras e esses valores

detectados foram mais próximos dos níveis relatados na literatura para o vinho (Anjos et al, 2003; Alkis et al., 2014; Vystavna et al., 2014).

Os elementos potássio e cálcio são componentes naturais da uva e sua concentração no vinho é um reflexo do estado da videira nos estágios finais do amadurecimento da baga. Um alto nível de potássio pode resultar na precipitação de hidrogenotartarato de potássio que se cristaliza em barris de vinho durante a fermentação do suco de uvas. Isso também pode ocorrer nos vinhos engarrafados antes que estejam completamente maduros. O tartarato de potássio pode se precipitar nas laterais da garrafa formando uma espécie de crosta que é chamada em algumas regiões de “borra” (Harris, 2003; Pyrzynska, 2004).

O conteúdo natural de cálcio pode ser afetado pela adição de CaCO_3 para a desacidificação e um nível elevado deste metal também pode levar ao início da precipitação com tartarato de cálcio (Pyrzynska, 2004). As concentrações encontradas foram de 418 a 959 mg L^{-1} e de 0,1 a 119 mg L^{-1} para o potássio e o cálcio, respectivamente. Esses valores estão de acordo com os valores relatados por outros trabalhos encontrados na literatura (Anjos et al, 2003; Dalipi et al., 2016; Gruber et al., 2006; Pessanha et al., 2010).

O cobre presente nas amostras de vinho analisado pode ser consequência da prática de pulverização dos parreirais, porque a maioria dos defensivos agrícolas utilizados contém cobre na composição (Scolary, 1997). Além disso, outra possível fonte de cobre no vinho é o resultado do uso de sulfato de cobre (CuSO_4) pra remover odores. O alto teor de cobre residual pode promover a deterioração oxidativa, o que, em última análise, resulta no brilho do vinho. Este fenômeno é chamado de "curtimento" e ocorre principalmente nos vinhos brancos, constituindo um dos principais problemas enológicos para os produtores de vinho (Pyrzynska, 2004).

Os íons Cu, Fe e Mn são os ativadores desse processo, que podem alterar as propriedades organolépticas do vinho ou promover o aparecimento de precipitados na bebida engarrafada. Este problema pode ser minimizado mantendo a concentração de cobre abaixo de 0,5 mg L^{-1} (Scolary, 1997). Neste trabalho foram encontradas as concentrações de cobre na faixa de 0,02-0,85 mg L^{-1} . Algumas amostras apresentaram concentrações acima desse limite

recomendado, sugerindo um possível uso de pesticidas agrícolas à base de sulfato de cobre.

O ferro é semelhante ao cobre no que diz respeito à formação de neblina e deterioração oxidativa (Oszmianski et al., 1994). A concentração de ferro encontrada variou de 0,013 a 17,40 mg L⁻¹, indicando que algumas amostras apresentaram concentrações superiores ao limite máximo estabelecido pela legislação brasileira que é de 15,0 mg L⁻¹ (MAPA, 2010).

Não há legislação para o manganês e a faixa de concentração encontrada variou de 0,203 a 5,32 mg L⁻¹. Esses valores de concentração estão de acordo com os encontrados em outros trabalhos da literatura (Anetta Ziola-Frankowska & Marcin Frankowski, 2017; Dalipi et al., 2016).

As ligas de chumbo têm sido amplamente utilizadas nas adegas devido à facilidade com que este metal pode ser formado mecanicamente. A principal fonte de contaminação por Pb é a via alimentar que contribui com aproximadamente 70% da ingestão de Pb, sendo o vinho a bebida alcoólica que tem apresentado as maiores concentrações (Pyrzynska, 2004). O limite máximo estabelecido para esse metal é 200 µg L⁻¹ (ANVISA, 2013; OIV, 2011).

Os valores das concentrações de Pb encontradas nas amostras de vinho analisadas (**Tabela 3.3**) confirmam esta redução. Todas as concentrações de Pb encontradas estavam de acordo com a legislação (OIV, 2011) e também com outros artigos da literatura. (Alkis et al., 2014; Dalipi. et al., 2016; Lemos et al., 2002; Vystavna et al., 2014)

Os elementos Ti, Ni, Cu, Zn e Sr apresentaram, concentrações menores que 2,3 mg L⁻¹. Esses valores estão de acordo com os encontrados em outros trabalhos da literatura. A presença desses elementos pode ser explicada devido ao contato com recipiente de aço inoxidável, utensílios e garrafas de vidro utilizados no processo de fabricação do vinho, processo exógeno ou endógeno (o sulfato de cobre é usado para pulverizar os vinhos para evitar o oídio) (Pyrzynska, 2004).

Os valores encontrados para todos os elementos (**Tabela 3.4**) estão dentro dos intervalos relatados por outros trabalhos (Anjos et al., 2003, Pessanha et al., 2010; Gruber et al., 2006). O ferro é encontrado em quantidades substanciais em todas as variedades de vinho. A concentração de ferro dos vinhos depende de vários fatores, sendo o mais importante o solo

onde as uvas são produzidas. O rubídio (Rb) é um elemento comumente encontrado em amostras de vinhos devido à sua afinidade química com K. Um comportamento semelhante é observado com Sr e Ca (Galani-Nikolakaki et al., 2002).

3.5. Conclusão

Foi desenvolvido e validado um método para determinação direta dos constituintes inorgânicos em amostras de vinho tinto por TXRF. O método é simples, rápido, consome pequenas quantidades de reagentes e permite a determinação de um grande número de analitos (P, S, Cl, K, Ca, Mn, V, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Br, Rb, Sr, Ba e Pb) simultaneamente. As concentrações da maioria desses elementos estão de acordo com a legislação brasileira, internacional e também com os resultados de outros artigos encontrados na literatura. O TXRF mostrou-se atraente e útil para análise de rotina, além de quantificar analitos, incluindo P, S, Cl e Br, que são mais difíceis de serem quantificados por outras técnicas espectrométricas.

Capítulo 4

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE ANÁLISE DIRETA DE CERVEJA UTILIZANDO FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X POR REFLEXÃO TOTAL

CAPÍTULO 4: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE ANÁLISE DIRETA DE CERVEJA USANDO FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X POR REFLEXÃO TOTAL

4.1. Introdução

A cerveja é uma bebida muito consumida mundialmente e uma das mais antigas do mundo. Essa bebida é feita a partir da fermentação alcoólica usando levedura em mosto de cerveja, que é originado de cevada, mas também pode ser obtido de outros cereais (arroz ou trigo), água e lúpulo (Keukelerie, 2000; Preedy, 2008). Durante o processo de produção da cerveja pode ocorrer contaminações por elementos inorgânicos que podem causar sérios problemas de saúde aos consumidores e também alterar a qualidade desse produto (Briggs, 2004; Pohl, 2008).

A avaliação desses elementos inorgânicos em cerveja é de grande interesse tanto para produtores quanto para consumidores. Isso porque, dependendo da concentração e da espécie química, esses elementos podem influenciar no processo de fermentação, na qualidade da cerveja e também podem ser tóxicos para o corpo humano (Preedy, 2008). Os constituintes inorgânicos da cerveja podem ser originados de fontes naturais (solo, água, grãos, lúpulo e fermento) e contaminação ambiental devido ao uso de fertilizantes, pesticidas, processos industriais e recipientes (Van Loon et al., 1993).

Os métodos oficiais para análise de cerveja promovem a destruição da matéria orgânica antes da medida por espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS) (Watson, 1994). Esse método envolve digestão ácida com H_2SO_4 e H_2O_2 em chapa de aquecimento, consumindo tempo e propenso a perdas e contaminações (Bellido-Milla et al., 2000). Isso pode ser minimizado com o uso de técnicas que permitem a análise direta de amostras sem necessitar que a mesma seja digerida, tais como a Fluorescência de Raios-X por Reflexão Total (TXRF).

O TXRF pode ser aplicado a uma grande variedade de matrizes, independentemente do seu estado físico: materiais biológicos (Guimarães et al.

2012), vegetais (Necemer et al., 2009), produtos farmacêuticos e medicamentos (Cinosi et al., 2011), alimentos e bebidas (Voica et al., 2015) sedimentos e fertilizantes (Resende et al., 2016), nanomateriais (Borgese et al., 2011) e materiais arqueológicos (Wobrauschek, 2007; Cariati et al., 2003) entre outros. Além disso, os procedimentos de calibração de TXRF são mais simples do que aqueles necessários para outras técnicas multielementares, como ICP-MS (Bruker, 2012; Dalipi et al., 2015; 2016).

4.2. OBJETIVOS

4.2.1. Geral

Desenvolver um método rápido, simples e com exatidão aceitável para determinação multielementar dos constituintes inorgânicos de amostras de cerveja usando como técnica de quantificação a TXRF.

4.2.2. Específicos

- i. Coletar amostras de cerveja industrializadas de diversos estados brasileiros;
- ii. Otimizar e validar o método desenvolvido;
- iii. Fazer digestão de algumas amostras de cerveja;
- iv. Aplicar o método validado na análise de diferentes amostras de cerveja.

4.3. Experimental

4.3.1. Instrumentação

As determinações das concentrações dos constituintes inorgânicos nas amostras de cerveja foram realizadas usando um espectrômetro portátil de fluorescência de raio – X por reflexão total, S2 PICOFOX™ de bancada (Bruker Nano GmbH, Karlsruhe, Alemanha). Esse espectrômetro TXRF é equipado com um tubo de Mo - K α 17,5 keV, uma fonte de excitação de 600 μ A, 50 kV, 50 W, um monocromador multicamada e um detector de derivado de silício (SDD) com uma área ativa de 10 mm². A resolução do detector era maior do

que 160V e 10 Kpcs (Mn K α). O tubo de raios-X tem proteção primária contra radiação feita de 5 mm de bronze e uma fina janela de berílio (100 μ m) pela qual os raios-X escapam para o exterior. Na direção do monocromador, é fornecida uma abertura de 3 mm para a emissão do feixe útil. A modelagem do feixe é realizada por meio de um sistema de abertura e resulta em uma forma de feixe na área de amostra de cerca de 7 x 0,1 mm². A monocromatização da radiação do tubo é feita através da reflexão de Bragg em uma multicamada. As multicamadas são construídas por camadas alternadas de elementos leves e pesados ou seus compostos.

O forno de micro-ondas com cavidade (Milestone, modelo Ethos 1, Itália) foi utilizado nas digestões ácidas assistidas por radiação de micro-ondas das amostras. Dez vasos fechados de 120 mL de PFA perfluoroalcoxi com um mecanismo de alívio de pressão selado calibrado, sendo que um deles é o frasco sensor, com controle de temperatura, foram inseridos em uma plataforma giratória dentro da cavidade do forno de micro-ondas e o programa de aquecimento foi realizado. A quantidade de amostra utilizada foi 12 mL.

4.3.2. Reagentes e materiais

Todos os reagentes utilizados foram de grau de analítico. Como padrão interno foram utilizadas soluções padrão de ítrio (Y), gálio (Ga) e germânio (Ge) com concentrações de 1000 mg L⁻¹ (Fluka Analytical, Buchs, Suíça). Também foram utilizadas soluções padrão de chumbo (Pb) e arsênio (As) (Fluka Analytical, Buchs, Suíça) com concentrações de 1000 mg L⁻¹ para preparar as amostras fortificadas.

Para o procedimento de digestão das amostras em forno de micro-ondas com cavidade foi utilizado ácido nítrico (67% de Merck, Darmstadt, Alemanha) e peróxido de hidrogênio (30%, Merck, Darmstadt, Alemanha).

Foram utilizados discos de vidro de quartzo de 30 mm de diâmetro e uma espessura de 3,0 \pm 0,1 mm como porta-amostra. A limpeza e hidrofobização foi realizada de acordo com o descrito no capítulo 3. As soluções foram preparadas com água deionizada ultrapura obtida em um sistema de purificação de água Milli-Q, modelo Direct-Q 3, Water Purification System (Millipore, EUA) com resistividade 18,2 M Ω cm.

4.3.3. Coleta e Pré-tratamento das Amostras

Foram analisadas trinta amostras de cerveja adquiridas em mercados de quatro estados brasileiros (Minas Gerais, Bahia, Sergipe e Santa Catarina). Sendo que dessas amostras, vinte eram de diferentes marcas cervejas industrializadas (Pilsen e cervejas escuras) amplamente consumidas pelos brasileiros.

As amostras de cerveja sofreram desgaseificação em um banho ultrassônico (Ultrasonic Cleaner 1400, Unique, São Paulo, Brasil). Para esse procedimento uma alíquota de 10,0 mL de cerveja foi adicionada a um tubo de polietileno de 15 mL e levado ao banho ultrassônico contendo água potável até a marca de segurança sugerida pelo fabricante. Essa amostra permaneceu no banho por um tempo de 30 minutos até observarmos que não se desprendia mais bolhas de dióxido de carbono (CO₂).

4.3.4. Otimização do Método

O método foi desenvolvido para a quantificação direta de componentes inorgânicos presentes em diferentes marcas de cervejas industrializadas usando TXRF. As variáveis estudadas foram os tempos de medição (100 s, 250 s, 500 s e 1000 s), o tipo de padrão interno (Ga, Y, Ge) e a concentração de padrão interno (1 e 10 mg L⁻¹) usando uma marca de cerveja escolhida aleatoriamente. A melhor condição do trabalho foi destinada a obter limites adequados de quantificação para a determinação de oligoelementos, como Pb e As, cujos limites máximos aceitáveis são estabelecidos pela legislação. Para isso, uma alíquota de 50,0 mL da amostra foi fortificada com 200 µg L⁻¹ de Pb e 100 µg L⁻¹ de As, de acordo com as concentrações estabelecidas pela legislação brasileira (ANVISA, 2013). As amostras com e sem fortificação foram analisadas diretamente pelo espectrômetro TXRF. O processamento dos espectros de raios-X e a contabilização de sobreposições de picos de fluorescência foram realizados utilizando o software SPECTRA versão 7.0 (Bruker Nano GmbH, Karlsruhe, Alemanha).

4.3.5. Validação do Método

Para avaliar o efeito da matriz, os resultados da análise direta foram comparados com os do procedimento de digestão ácida assistido por um forno de micro-ondas. Cinco mililitros de amostra de cerveja (fortificada com Pb e As e não fortificadas) foram colocados em um vaso de PFA (perfluoroalcoxi) e digeridos com 2,0 mL de HNO₃ a 65% e 1,0 mL de H₂O₂ em um forno de micro-ondas cavidade. O programa de aquecimento foi realizado em três etapas: primeiro etapa - 5 min a 180 ° C, segunda etapa - 10 min a 180 ° C e terceira etapa - 30 minutos de ventilação. Após o resfriamento, as amostras foram transferidas para os tubos de polietileno e o volume foi ajustado para 12,0 mL com água ultrapura e analisado por TXRF usando as melhores condições de trabalho estabelecidas.

Para avaliar a precisão e a exatidão, dois materiais de referência certificados, NIST 1640a (elementos traço em água natural) e EnvironMAT EU-H-4 (Waste Water) foram analisados em quadruplicata usando as melhores condições.

4.3.6. Análise de Amostras de Cerveja por TXRF

Após se estabelecer as melhores condições do método e realizar a validação analisou-se 30 amostras de cerveja comerciais nas condições estabelecidas: foram adicionados 100 µL de Ga (padrão interno) na concentração de 10 mg L⁻¹ em 900 µL de amostras de cerveja desgaseificada. A solução resultante foi completamente homogeneizada (dispositivo Vortex) e uma alíquota de 10 µL foi transferida para um disco de quartzo e seca em estufa a 70 °C durante 10-15 min. As amostras foram preparadas em triplicata.

As amostras finais para análise de TXRF continham filmes finos e circulares de cerveja sobre os porta-amostras de vidro de quartzo. O tempo de aquisição de dados foi de 500 s por amostra. Os analitos determinados foram P, S, Cl, K, Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Br, Rb, Sr e Pb.

4.4 Resultados e Discussão

4.4.1. Desenvolvimento do Método

4.4.1.1. Avaliação do Padrão Interno

A avaliação do padrão interno (PI) foi realizada pela adição de uma quantidade definida de solução padrão monoelementar. A concentração de padrão interno depende da concentração de elementos na amostra. O elemento escolhido como PI não pode estar presente na própria amostra, e as linhas de fluorescência do mesmo não devem interferir com os elementos de interesse na amostra. Assim, foi avaliado a influência dos elementos Ga, Y e Ge como padrão interno em duas concentrações: 1 e 10 mg L⁻¹ para a quantificação de As e Pb.

Foram obtidos melhores resultados para Pb e As ($103 \pm 2\%$ e $108 \pm 3\%$, respectivamente) com o padrão interno Ga na concentração de 1,0 mg L⁻¹ (**Tabela 4.1**). Quando foram utilizados 10 mg de L⁻¹ Ga, foram obtidas menores valores de recuperações, devido a interferências espectrais causadas pelo alargamento do pico de Ga ($K\alpha_1 = 10,26$ keV) que está próximo do Pb ($L\alpha_2 = 10,44$ keV) e As ($K\alpha_1 = 10,54$ keV). O uso de 1,0 mg L⁻¹ Y e Ge como padrão interno apresentou valores de recuperação superestimados enquanto Y e Ge ambos na concentração de 10,0 mg L⁻¹ levaram a subestimar porcentagens de recuperação. Portanto, Ga foi o padrão interno escolhido para experimentos posteriores.

Tabela 4.1. Resultados experimentais para avaliação do padrão interno (Ga, Y e Ge) em amostras de cerveja fortificadas no nível de 200 e 100 µg L⁻¹ de Pb e As, respectivamente (n = 3) com tempo de medição de 500 s.

Elemento	Recuperação (%) Y		Reuperação (%) Ge		Recuperação (%) Ga	
	(1,0 mg L ⁻¹)	(10,0 mg L ⁻¹)	(1,0 mg L ⁻¹)	(10,0 mg L ⁻¹)	(1,0 mg L ⁻¹)	(10,0 mg L ⁻¹)
Pb	133 ± 2	62 ± 1	175 ± 2	36 ± 10	103 ± 2	65 ± 1
As	204 ± 4	84 ± 2	155 ± 3	62 ± 17	108 ± 3	81 ± 2

4.4.1.2. Avaliação do Tempo de Medida

Maiores tempos de análise resultam em menores LDs e é importante para estabelecer o tempo mínimo necessário para obter os limites de quantificação que atendem os valores da legislação para Pb e As e também que sejam suficientemente baixos para a determinação de outros oligoelementos na cerveja, como Cu, Ni, Zn, etc.

Os tempos de integração do sinal investigados foram: 100, 250, 500 e 1000 s usando Ga como um padrão interno a uma concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$. Os resultados (**Tabela 4.2**) mostraram que o 500 s foram suficientes para se obter limites de quantificação adequados para atender a legislação e se obter um perfil dos constituintes inorgânicos presentes na cerveja, com uma frequência analítica razoável.

Tabela 4.2. Efeito do tempo de medição no menor limite de quantificação (LQ) para P, S, Cl, K, Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Br, Rb, Sr e Pb na amostra de cerveja.

Elemento	Tempo de medida (s)			
	100	250	500	1000
LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)				
P	5256	3160	2190	1586
S	2927	1778	1234	886
Cl	1787	1083	755	542
K	700	421	293	209
Ca	447	270	187	132
Mn	103	63	44	33
Fe	84	52	37	26
Ni	59	37	26	18
Cu	51	33	22	15
Zn	48	30	18	15
As	37	22	15	11
Br	37	22	15	11
Rb	40	26	18	11
Sr	48	30	22	15
Pb	48	30	22	15

4.4.2. Validação do Método

Inicialmente, avaliou-se a seletividade, verificando se a matriz causaria alguma interferência na análise direta da cerveja. Para isso comparou-se os resultados obtidos com as amostras analisadas pelo método proposto com aqueles obtidos após a digestão ácida das amostras. A seletividade é o grau em que um método pode quantificar com precisão um analito na presença de interferentes da matriz. Em geral, não foram observadas diferenças

significativas no nível de confiança de 95% entre os resultados obtidos para as amostras *in natura* em comparação com as amostras digeridas.

Como esperado, as amostras digeridas apresentaram menor concentração de cloreto ($1,8 \pm 0,7 \text{ mg L}^{-1}$) e brometo ($0,01 \pm 0,01 \text{ mg L}^{-1}$) que as amostras sem digerir (cloreto $148 \pm 2 \text{ mg L}^{-1}$ e brometo $0,48 \pm 0,03 \text{ mg L}^{-1}$). Os procedimentos de digestão ácida não são adequados para a determinação de halogenetos devido à formação de ácidos (HCl e HBr), que são perdidos por volatilização. As recuperações mais baixas foram verificadas para as amostras digeridas, o que também pode ser devido às perdas por volatilização (**Tabela 4.3**).

Tabela 4.3 Resultados experimentais comparando as amostras de cerveja digeridas com os resultados sem digerir na recuperação de Pb 200 e As 100 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Elemento	Amostra Digerida	Amostra sem digerir
	Recuperação (%)	
Pb	$50,0 \pm 0,1$	$102,3 \pm 0,2$
As	$30,0 \pm 0,03$	$107,4 \pm 0,1$

A precisão e a exatidão foram determinadas pela análise do NIST SRM 1643E (elementos traço na água) e do EnvironMAT EU-H-4 (águas residuais). Não existem materiais de referência certificados para a matriz cerveja e por isso as amostras de água foram utilizadas. Os resultados obtidos (**Tabela 4.4**) sugerem que o método é viável para a determinação de micro e macroelementos em amostras de cerveja. Em geral, as concentrações medidas de elementos individuais no CRM concordam com os valores certificados no nível de confiança de 95%. Para Fe, os valores superestimados foram obtidos devido à contaminação dos discos de quartzo siliconado. Cloreto, brometo e enxofre não apresentavam valores certificados nos CRM analisados.

A precisão, expressa como desvio padrão relativo (DPR%), variou de 1,0 a 17,4% e foi considerada satisfatória. Em geral, há uma tendência de que o DPR mais alto esteja associado à menor concentração de analitos nas amostras, principalmente concentrações próximas aos LQs estimados.

Tabela 4.4. Avaliação da precisão e da exatidão do método proposto.

Elemento	NIST 1640a			EnvironMAT EU-H-4		
	Valor obtido ($\mu\text{g L}^{-1}$) ^a	Valor certificado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DPR (%)	Valor obtido (mg L^{-1}) ^a	Valor certificado (mg L^{-1})	DPR (%)
P	< 50	NC	-	8,1±0,6	10,5	7,2
S	320±17	NC	5,5	0,09±0,02	NC	17,4
Cl	99±13	NC	13,1	< 0,045	NC	-
K	595±66	580±2	11,1	41±2	44,7	3,9
Ca	5814±59	5615±21	1,0	37,8±1,5	41,3	3,8
Cr	39±2	40,54±0,30	3,9	0,39±0,01	0,395	2,3
Mn	42±2	40,39±0,36	5,5	0,48±0,01	0,452	2,1
Fe	84±3	36,8±1,8	3,1	0,60±0,05	0,577	8,3
Co	18,8±0,50	20,24±0,24	2,7	0,53 ±0,08	0,499	15,1
Ni	27±1	25,32±0,14	3,9	0,802±0,009	0,739	1,1
Cu	80±1	85,75±0,51	1,6	0,72±0.01	0,741	1,4
Zn	50±2	55,64±0,35	4,7	0,796±0,009	0,871	1,1
As	10,3±0,9	8,06±0,07	8,6	0,816±0,009	0,779	1,1
Se	19±1	20,13±0,17	5,3	0,124±0,005	0,135	4,0
Sr	123±2	126±1	1,3	0,92±0,03	0,914	3,3
Ba	140±4	151,8±0,83	2,6	1±0,1	1,07	7,0
Br	7±0,5	NC	7,7	< 0,003	NC	-
Pb	10,5±2	12,10±0,05	16,7	0,59±0,06	0,612	10,2

^a n = 4

4.4.3. Aplicação do Método Proposto para a Determinação de Elementos Inorgânicos em Amostras de Cerveja

O método foi aplicado para a determinação de P, S, Cl, K, Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Br, As, Rb, Sr e Pb em 30 amostras de cerveja. Os resultados desta

análise são verificados na **Tabela 4.4**. A concentração desses constituintes inorgânicos nas cervejas analisadas variou amplamente. No entanto, a maioria dos resultados está de acordo com as concentrações desses elementos na literatura (Dhara et al., 2012).

Uma explicação para essa variação na concentração desses elementos é a possível contaminação durante o processo de produção de cerveja. A disponibilidade do elemento no solo para a absorção pelas plantas é outro fator importante a ser considerado. A disponibilidade depende da capacidade de troca catiônica do solo que pode variar muito com o tipo de solo, pH e composição mineral. Outros fatores, como a área de plantio e colheita da cultura, fertilização, água de irrigação e fungos micorrízicos na zona radicular também devem ser considerados (Chaves et al., 2010; Naozuka et al., 2011). A qualidade da água utilizada na produção de cerveja também altera significativamente a concentração dos constituintes inorgânicos no produto final (Pohl, 2008).

Dentre os elementos estudados apenas, As e Pb são controlados pela legislação brasileira. Os valores encontrados para esses oligoelementos estão abaixo do valor máximo permitido que é de 100 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente (ANVISA, 2013). O método desenvolvido não é seletivo para Cd na presença de uma quantidade elevada de K, porque não é possível quantificá-lo nas amostras de cerveja analisadas por TXRF com tubo de molibdênio. O Ni não foi detectado na maioria das amostras avaliadas.

As altas concentrações de K e P podem ser originárias da matéria-prima (lúpulo, cevada e outros grãos) utilizados no processo de fabricação de cerveja. Levedura também é uma fonte rica desses elementos. O cálcio também está presente, embora em menores concentrações na matéria-prima. A água também é uma fonte importante desse elemento. O lúpulo também pode fornecer oligoelementos como Zn, Mn e Fe em particular (Preedy, 2008), para cervejas.

O arsênio está presente em alimentos e bebidas devido à sua ampla distribuição no meio ambiente a partir de fontes naturais e / ou antropogênicas. A ingestão excessiva de As pelo corpo pode ser potencialmente tóxica, e o Conselho da União Européia (European Union Council, 2002) e a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2006) estabeleceram o nível máximo permitido de 10

$\mu\text{g L}^{-1}$ para As em água potável. Espanha (Espanha, 1995) e Brasil (ANVISA, 2005) estabeleceram $100 \mu\text{g L}^{-1}$ como a quantidade aceitável de As em cerveja. A **Tabela 4.5** ilustra a concentração média de arsênio encontrada nas amostras de cervejas analisadas como $0,01 \pm 0,07 \text{ mg L}^{-1}$ (de 0,01 a $0,1 \text{ mg L}^{-1}$). Esses valores estão abaixo da concentração máxima estabelecida pela legislação brasileira (ANVISA, 2013).

O Pb é um dos metais mais abundantes e tóxicos (Concon, 1998). A fonte de Pb em cerveja e outras bebidas alcoólicas pode estar relacionada à contaminação de processos tecnológicos de fermentação. Alguns autores relataram níveis de Pb variando de 13 a $52 \mu\text{g L}^{-1}$ em amostras de cerveja no Brasil (Alcázar, 2002), 0,001 a $0,006 \text{ mg L}^{-1}$ em amostras de cerveja espanholas e 0,003 - $0,024 \text{ mg L}^{-1}$ em amostras de cerveja alemãs (Coelho et al., 2005; Zufall e Tyrell, 2008). Neste estudo, uma amostra de cerveja apresentou concentração de chumbo ($0,18 \text{ mg L}^{-1}$) acima da concentração máxima permitida de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ (ANVISA, 2013). No entanto, na maioria das amostras, as concentrações desse elemento estão abaixo do nível máximo previsto pela legislação brasileira.

Tabela 4.5. Concentração (mg L^{-1}) dos micro e macroelementos e oligoelementos em 30 amostras de cervejas (valores mínimos e máximos, média e desvio padrão (DP)).

Elemento	Mínimo	Máximo	Média	DP
P	37,40	149,85	84,07	28,87
S	10,32	50,73	23,42	8,17
Cl	82,74	281,71	163,02	48,12
K	183,79	418,47	261,13	70,09
Ca	9,82	96	40,73	22,45
Mn	0,06	1,42	0,53	0,47
Fe	0,07	1,57	0,27	0,27
Ni	<LD	1,13	0,16	0,28
Cu	<LD	0,32	0,11	0,07
Zn	0,02	1,98	0,12	0,36
As	<LD	0,10	0,01	0,074
Br	0,01	2,04	0,55	0,61
Rb	<LD	0,2	0,27	0,14
Sr	<LD	0,41	0,24	0,11
Pb	<LD	0,18	0,01	0,06

As investigações realizadas em relação ao Mn foram focadas em sua importância como nutriente de fermento (Mochaba et al., 1996). O teor desse metal na cerveja é principalmente influenciado pela matéria-prima de cereais utilizada durante o processo de fabricação (Pohl, 2008). Os resultados para Mn encontrados nas cervejas de amostra analisadas variam de $0,06 \text{ mg L}^{-1}$ a um máximo de $1,4 \text{ mg L}^{-1}$. Não há legislação brasileira para este metal na cerveja, no entanto, quando comparado com o limite máximo para água $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ (Stefano & Montanari, 1996), pode-se observar que algumas amostras apresentaram concentrações mais elevadas do que o permitido (**Tabela 4.5**).

A presença de cobre em amostras de cerveja é produzido por matérias-primas, mas também pode ser introduzido a partir de substâncias adicionadas durante infusão, como lúpulo, ácidos, bases, sílica gel ou outros aditivos estabilizadores e água de diluição (Weissler, 1995). Recomenda-se que a cerveja não exceda as concentrações de cobre superiores a $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ (Pohl

& Prusisz, 2004). Portanto, as determinações de cobre são consideradas importantes e devem ser incluídas em todas as análises de cerveja.

As concentrações de ferro e cobre encontradas neste estudo variaram entre 0,01 e 1,57 mg L⁻¹ e de <LD a 0,32 mg L⁻¹, respectivamente, indicando possível contaminação de algumas amostras quando comparadas aos resultados encontrados na literatura. As concentrações de Fe e Cu variaram entre 0,096 e 0,920 mg L⁻¹ e entre 0,024 e 0,080 mg L⁻¹, respectivamente, em amostras de cerveja espanholas. Em outro trabalho foram encontrados concentrações de 0,019 a 0,800 mg L⁻¹ e 0,040 a 1,550 mg L⁻¹ respectivamente para Fe e Cu em amostras de cervejas alemãs (Alcázar et al., 2002; Briggs et al., 2004; Pohl & Prusisz, 2004; Vinas et al., 2002).

Em média, o corpo de um adulto contém aproximadamente 33 mg kg⁻¹ de zinco porque é um elemento essencial que compõe muitas enzimas envolvidas em várias funções fisiológicas, como a síntese proteica e o metabolismo energético (Briggs et al., 2004). No entanto, as altas concentrações de Zn são prejudiciais para leveduras e a deficiência de fermentação prejudica o progresso da fermentação. Os valores de Zn encontrados na literatura variam de 0,013 a 1,5 mg L⁻¹ (Bellido-Milla et al., 2000; Nascentes et al., 2005), enquanto a concentração máxima de Zn estabelecida pela legislação espanhola é de 1 mg L⁻¹ (Espanha, 1995). Os valores de Zn encontrados neste trabalho variam de 0,02 a 1,98 mg L⁻¹, indicando a contaminação de algumas amostras de cerveja. Isso pode ter influenciado o processo de fermentação do fermento.

4.5. Conclusão

O método desenvolvido mostrou ser simples, rápido, consome pequenas quantidades de reagentes e permite a determinação de um grande número de analitos (P, S, Cl, K, Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Br, Rb, Sr, Pb) simultaneamente. O TXRF mostrou-se atraente e útil para análise de rotina, além de quantificar analitos, como P, S, Cl e Br, que são mais difíceis de quantificar por outras técnicas de espectrometria.

CAPÍTULO 5.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

CAPÍTULO 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este capítulo apresenta as contribuições desta tese e as perspectivas de trabalhos futuros que podem dar continuidade à pesquisa nela apresentada.

O sistema PEO 1500 + Na₂SO₄ + leite aplicado para a extração dos íons cádmio usando o iodeto de potássio como agente extrator. A eficiência da extração desse metal foi afetada fortemente pelos seguintes parâmetros: quantidade de agente extrator adicionado, tipo de eletrólito, mas não foi afetada significativamente pelo comprimento da linha de amarração e nem pela razão mássica das fases. Na ausência de iodeto, o Cd(II) permaneceu concentrado na fase rica em eletrólito do sistema, obtendo-se os valores %E inferior a 0,6%. Com a adição de iodeto, o Cd(II) foi extraído quantitativamente para a fase superior do SAB, com um máximo de %E de (102,0 ± 1,62)%. O método desenvolvido apresentou limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, precisão e sensibilidade satisfatórios, especialmente se for levada em consideração a técnica instrumental relativamente simples utilizada. Além disso, o método é simples, rápido, econômico e gera uma quantidade mínima de resíduos, por permitir extrair os íons Cd(II) no primeiro CLA, atendendo aos princípios da Química Verde.

Essa tese também descreve o desenvolvimento de um outro método para determinação direta de constituintes inorgânicos em amostras de vinho tinto por TXRF. Pode-se concluir que o método é simples, rápido, apresenta baixo consumo de reagentes e permite a determinação de um grande número de analitos (P, S, Cl, K, Ca, Mn, V, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Br, Rb, Sr, Ba, Pb) simultaneamente. As concentrações da maioria desses elementos estão de acordo com a legislação brasileira, internacional e também com os resultados de outros trabalhos encontrados na literatura. O TXRF mostrou-se atraente e útil para análises de rotina, além de quantificar os analitos, incluindo P, S, Cl e Br, que são mais difíceis de quantificar por outras técnicas espectrométricas.

O último método envolve a determinação direta de constituintes inorgânicos em amostras de cerveja por TXRF. O método é simples, rápido, consome baixas quantidades de reagentes e permite a determinação de um grande número de analitos (P, S, Cl, K, Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Como, Br, Rb,

Sr, Pb) simultaneamente. TXRF provou ser atraente e útil para análises de rotina, além de quantificar os analitos, incluindo P, S, Cl e Br, que são mais difíceis de se quantificar por outras técnicas espectrométricas.

O trabalho desenvolvido traz, portanto, contribuições importantes na área da Química Analítica, sugerindo métodos mais simples e viáveis de serem implementados na rotina de laboratórios de controle de qualidade de alimentos. Nesse contexto, para trabalhos futuros sugere-se a realização de estudos colaborativos em diferentes laboratórios para confirmar a aplicabilidade dos novos métodos.

Adicionalmente como perspectivas futuras, seria interessante fornecer esses resultados para os órgãos legisladores, já que a legislação brasileira só fiscaliza os elementos Cd, As e Pb em vinho e cerveja. Posteriormente pode-se tentar aplicar os métodos desenvolvidos à outros tipos de bebidas, tais como chás, cachaça e *whisky*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas

Abdulkhaliq, A., Swaileh K. M., Hussein , R. M., Matani, M. Levels of metals (Cd, Pb, Cu and Fe) in cow's milk, dairy products and hen's eggs from the West Bank, Palestine. *International Food Research Journal* 19 (2012) 1089-1094.

Aceto, M., Abollino, O., Bruzzoniti, M.C., Mentasti, E., Sarzanini, C., Malandrino, M. Determination of metals in wine with atomic spectroscopy (flame-AAS, GF-AAS and ICP-AES): a review. *Food Additives and Contaminants* 19 (2002) 126–133.

Alcázar, A., Pablos, F., Martín, M. J., González, A. G. Multivariate characterisation of beers according to their mineral content, *Talanta* 57 (2002) 45–52.

Al-Awadi, F.M.; Srikumar, T.S. Trace-element status in milk and plasma of Kuwaiti and non-Kuwaiti lactating mothers. *Nutrition*, 6, (2000) 1069-1073.

Albertsson, P. Chromatography and partition of cells and cell fragments. *Nature*, (1956), 177, 771.

Ali, K. et al. Metabolic constituents of grapevine and grape-derived products. *Phytochemistry Reviews*, 9 (2010) 357-378.

Alkiş T. M., Öz S., Atakol A., Yilmaz N., Anli R. E., Atakol O. Investigation of heavy metal concentrations in some Turkish wines. *Journal Food Composition Analysis* 33 (2014)105–110.

Almeida, C.M.R., Vasconcelos, M.T.S.D., Barbaste, M., Medina, B., 2002. ICP-MS multi-element analysis of wine samples – a comparative study of the methodologies used in two laboratories. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 374 (2002) 314–322.

Al Nasir, F., Jiries, A.G., Batarseh, M.L., Beese, F. Pesticides and trace metals residue in grape and home made wine in Jordan. *Environmental Monitoring and Assessment*, 66 (2001) 253-263.

Alvarez, J., Marcó, L.M., Arroyo, J., Greaves, E.D., Rivas, R. Determination of calcium, potassium, manganese, iron, copper and zinc levels in representative samples of two onion cultivars using total reflection X-ray fluorescence and ultrasound extraction procedure, *Spectrochimica Acta Part B* 58 (2003) 2183–2189.

Andrigueto, J.M.; Perly, L.; Minardi, I.; Gemael, A.; Flemming, J.S.; Souza, G.A.; Bona Filho, A. Os princípios nutritivos e suas finalidades. In: _____. *Nutrição animal*. 4.ed. São Paulo: Nobel, 1990. p.189-255.

Ananthapadmanabhan, K.P., Goddar E.D. Aqueous biphasic formation in polyethylene oxide-inorganic salt systems, *Langmuir* 3 (1987) 25–31.

Anjos, M.J., Lopes, R.T., De Jesus, E.F. O., Moreira, S., Barroso, R.C., Castro, C.R.F. Trace elements determination in red and white wines using total-reflection X-ray fluorescence. *Spectrochim. Acta B At. Spectrosc.*, 58 (2003) 2227-2232.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO – RDC nº 42, de 29 de agosto de 2013. Dispõe sobre o Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Limites Máximos de Contaminantes Inorgânicos em Alimentos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, Seção 1, 30 agosto 2013. pp. 34–35.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Decreto nº 3.029, de 16 de abril de 1999, c/c o art. 111, inciso I, alínea “e” do Regimento Interno aprovado pela Portaria nº 593, de 25 de agosto de 2000, publicada no DOU de 22 de dezembro de 2000, em reunião realizada em 6 de dezembro de 2004. Dispõe sobre o Regulamento Técnico Sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de Proteína, Vitaminas e Minerais.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO – RDC nº 274, de 22 de setembro de 2005. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para Águas Envasadas e Gelo. Publicação: D.O.U. – Diário Oficial da União; Poder Executivo.

Aquarone, E. Biotecnologia Industrial. 1. ed. São Paulo: Edgar Blücher, 2001.

Araújo, F.B.; Silva, P.H.A.; Minim, V.P.R. Perfil sensorial e composição físico-química de cervejas provenientes de dois segmentos do mercado brasileiro. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 23 (2003) 121-128.

Araújo, R.G.O, Dias, F.D.S., Macedo, S.M., Dos Santos, W.N.L., Ferreira, S.L.C. Method development for the determination of manganese in wheat flour by slurry sampling flame atomic absorption spectrometry. *Food Chem*, 101 (2007) 397–400.

Asfaw, A., Wibetoe, G. 2005. Direct Analysis of Beer by ICP-AES: A Very Simple Method for the Determination of Cu, Mn and Fe. *Microchimica Acta*, 152 (2005) 61–68.

Ataro, A.; Mccrindle, R.I.; Botha, B.M.; Mccrindle, C.M.E.; Ndibewu, P.P. Quantification of trace elements in raw cow's milk by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). *Food Chemistry*, 111 (2008) 243–248.

Ayar, A., Sert, D., Akin, N. The trace metal levels in milk and dairy products consumed in middle Anatolia – Turkey. *Environmental Monitoring and Assessment*, 152 (2009) 1–12.

Azcarate S. M., Martinez L. D., Savio M., Camina J. M., Gil R. A. Classification of monovarietal Argentinean white wines by their elemental profile. *Food Control*, 57 (2015) 268-274.

Baird, C.; Cann, M. Química Ambiental. 4ª edição, Porto Alegre: Editora Bookman; 2011.

Baize D., Sterckeman T. Of the necessity of knowledge of the natural pedo-geochemical background content in the evaluation of the contamination of soils by trace elements. *The Science of the Total Environment*, 264 (2001) 127–139.

Bamforth, C. W. Beer: an ancient yet modern biotechnology. *The Chemical Educator*, 5(3), 102-112, 2000.

Bamforth, C.W. Nutritional aspects of beer—a review. *Nutrition Research*, 22(1), 227-237, 2002.

Bamforth, C. Beer: tap into the art and science of brewing. Nova Iorque, Oxford University Press, 2009.

Bat, K.B., Vidrih, R., Nečemer, M., Vodopi, M., Mulič, I., Kump, P.N. Ogrinc, Characterization of Slovenian apples with respect to their botanical and geographical origin and agricultural production practice, *Food Technol. Biotechnol.* 50 (2012) 107–116.

Bellido-Milla, D., Moreno-Perez, J. M., Hernández-Artiga, M. P. Differentiation and classification of beers with flame atomic spectrometry and molecular absorption spectrometry and sample preparation assisted by microwaves, *Spectrochim. Acta B* 55 (2000) 855–864.

Belsley, D.A., Kuh, E., Welsch, R.E. Regression diagnostics: identifying influential data and sources of collinearity, Wiley, New York, 1980.

Bermejo, P.; Dominguez, R.; Bermejo, A. Direct determination of Fe and Zn in different components of cow milk by FAAS with a high performance nebulizer. *Talanta*, v.45, p.325, 1997.

Bilandzic, N., Dokic, M., Sedak, M., Solomun B., Ivana Varenina, I., Knez'evic' Z., Benic, M. Trace element levels in raw milk from northern and southern regions of Croatia. *Food Chemistry*, 127 (2011) 63–66.

Bilo, F., Lodolo, M., Borgese, L., Bosio, A., Benassi, L., Depero, L. E., Bontempi, E. Evaluation of heavy metals contamination from environment to food matrix by TXRF: the case of rice and rice husk, *J. Chem.* 2015 (2015) 12.

Borges, S. S. O., Beinner, M.A., Silva, J.B.B. Direct Method for Determination of Al, Cd, Cu, and Pb in Beers In Situ Digested by GF AAS Using Permanent Modifiers. *Biol Trace Elem Res* 167 (2015) 155-163.

Borgese, L., Zacco, A., Pal, S., Bontempi, E., Lucchini, R., Zimmerman, N., Depero, L. A new non-destructive method for chemical analysis of particulate matter filters: the case of manganese air pollution in Vallecamonica (Italy), *Talanta* 84 (2011) 192–198.

Borgese L., Bilo F., Tsuji K., Fernández-Ruiz R., Margui E., Strelci C., Pepponi G., Stosnach H., Yamada T., Vandenabeele P., Maina D. M., Gatari M., Shepherd K. D., Towett E. K., Bennun L., Custo G., Vasquez C., Depero L. E. First Total Reflection X-Ray Fluorescence round-robin test of water samples: preliminary results, *Spectrochimica Acta Part B* 101 (2014) 6–14.

Borgese, L., Bilo, F., Dalipi, R., Bontempi, E., Depero, L. E. Total reflection X-ray fluorescence as a tool for food screening. *Spectrochimica Acta Part B* 113 (2015) 1–15.

Borgese, L., Dalipi, R., Riboldi, A., Bilo, F., Zacco, A., Federici, S., Bettinelli, M., Bontempi, E., Depero, L. E. Comprehensive approach to the validation of the standard method for total reflection X-ray fluorescence analysis of water *Talanta* 181 (2018) 165-171.

BRASIL. Decreto nº 2314, de 04 de Junho de 2009, art. 36 a art. 50. Regulamenta a Lei no 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. *Diário Oficial, Brasília*, 05 jun. 2009. Seção 1, p. 20.

BRASIL. Decreto nº 2314, de 04 de setembro de 1997. Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 05 de setembro de 1997. p. 19549.

Bridges, N.J.; Gutowski, K.E.; Rogers, R.D. Investigation of aqueous biphasic systems formed from solutions of chaotropic salts with kosmotropic salts (salt–salt ABS) *Green Chemistry*, 9 (2006) 177.

Briggs, D.E., Boulton, C.A., Brookes, P.A., Stevens, R. *Brewing: Science and Practice*, Woodhead Publishing, Cambridge, UK, (2004).

BRUKER, S2 Picofox: User Manual, Bruker, Berlin, 2012.

Bulgariu, L., Bulgariu, D. Hg (II) extraction in a PEG-based aqueous two-phase system in the presence of halide ions. I. Liquid phase analysis, *Cent. Eur. J. Chem.* 4 (2) (2006) 246–257.

Bulgariu, L., Bulgariu, D., Sarghie, I., Malut, T.. Cd(II) Extraction in PEG-based two-phase aqueous systems in the presence of iodide ions. *CEJC* 5 (2007) 291–302.

Bulgariu, L., Bulgariu, D., Extraction of metal ions in aqueous polyethylene glycol–inorganic salt two-phase systems in the presence of inorganic extractants: correlation between extraction behaviour and stability constants of extracted species, *Journal of Chromatography A* 1196–1197 (2008) 117–124.

Bulgariu, L., Bulgariu, D. Cadmium extraction in PEG(1550) – (NH₄)₂SO₄ twophase systems using halide extractants, *J. Serb. Chem. Soc.* 73 (3) (2008) 341–350.

Bulgariu, L., Bulgariu, D. Selective extraction of Hg(II), Cd(II) and Zn(II) ions from aqueous media by a green chemistry procedure using aqueous two-phase systems, *Separation and Purification Technology*. 118 (2013) 209–216.

Cabezas, Jr. H. Theory of phase formation in aqueous two-phase systems, *J. Chromatogr. B* 680 (1996) 3–30.

Cariati, F., Fermo, P., Gilardoni, S. A new approach for archaeological ceramics analysis using total reflection X-ray fluorescence spectrometry, *Spectrochim. Acta B* 58 (2003) 177-184.

Catarino, S., Curvelo-Garcia, A.S., Sousa, R.B. Revisão: elementos contaminantes nos vinhos. *Ciência Téc. Vitiv.* 23 (2008)3-19.

Carvalho, M. L. Study of Heavy Metals in Madeira Wine by Total Reflection X-ray Fluorescence Analysis, *25(1996)* 29-32.

Chaves, E.S., Santos, E.J., Araújo, R.G.O., Oliveira, J.V., Frescura, V.L.A., Curtis, A. J. Metals and phosphorus determination in vegetable seeds used in production of biodiesel by ICP OES and ICP-MS, *Microchem. J.* 96 (2010) 71–76.

Chaignon, V., Sanchez-Neira, I., Herrmann, P., Jaillard, B., Hinsinger, P. Copper bioavailability and extractability as related to chemical properties of contaminated soils from a vine-growing area *Environmental Pollution*,123 (2003) 229-238.

Chopin, E.I.B., Marin, B., Mkoungafoko, R., Rigaux, A., Hopgood, M.J., Delannoy, E., Cancès, B., Laura, M. Factors affecting distribution and mobility of trace elements (Cu, Pb, Zn) in a perennial grapevine (*Vitis vinifera* L.) in the Champagne region of France. *Environmental Pollution*,156(2008), pp. 1092-1098.

Cinosi, A., Andriollo, N., Pepponi, G., Monticelli, D. A novel total reflection X-ray fluorescence procedure for the direct determination of trace elements in petrochemical products, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 927–933.

Coelho, N.M.M., Coelho, L.M., De Lima, L.M., Pastor, A., De La Guardia, M. Determination of arsenic compounds in beverages by high-performance liquid

chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry, *Talanta* 66 (2005) 818–822.

Concon, J. M. *Food Toxicology*, Marcel Dekker, New York, NY, 1998.

Coni, E., Bocca, A., Coppolelli, P., Caroli, S., Cavallucci, C., Trabalza, S., et al. . Minor and trace element content in sheep and goat milk and dairy products. *Food Chemistry*, 57 (1996) 253–260.

Da Silva, L. H., Da Silva M. D. H., De Sousa R. D. S., Martins J. P., Rodrigues G. D., Coimbra J. S. R., Minim L. A. Surface Excess Enthalpy of PEO + Salt +Water and L35 + Salt + Water Aqueous Two Phase Systems. *J. Chem. Eng.* 54 (2010) 531- 535.

Da Silva, L. H. M., Da Silva, M. D. H., Amin, J., Martins, J. P., Coimbra, J. S. D., Minim, L. A. Hydrophobic effect on the partitioning of $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO})]^{2-}$ and $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ anions in aqueous two-phase systems formed by triblock copolymers and phosphate salts. *Sep. Purif. Technol.*, 60 (2008) pp. 103–112.

Da Silva, M. C. H., Da Silva, L. H. M., Junior, J. A., Guimaraes, R. O., Martins, J. P., Liquid–liquid equilibrium of aqueous mixture of triblock copolymers L35 and F68 with Na_2SO_4 , Li_2SO_4 , or MgSO_4 , *J. Chem. Eng. Data* 51 (2006) 2260–2264.

Da Silva, M.C.H.; da Silva L.H.M.; Paggioli, F.J.A. Novel Micelar Medium Using Triblock Copolymer for Cobalt Determination. *Analytical Sciences*, 21 (2005) 933 – 937.

Da Silva, M.C.H.; Da Silva, L.H.M.; Paggioli, F.J.; Coimbra, J.S.R.; Minim, L.A. Sistema aquoso bifásico: uma alternativa eficiente para extração de íons. *Quimica Nova*, 29 (2006) 1332 – 1339.

Dalipi, R., Borgese L., Zacco A., Tsuji K., Sangiorgi E., Piro R., Bontempi E., Depero L. E. Determination of trace elements in Italian wines by means of total reflection X-ray fluorescence spectroscopy, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* (2015) 1–11.

Das, S., Santani, D.D., Dhalla, N.S. Experimental evidence for the cardioprotective effects of red wine. *Experimental Clinical Cardiology* 12 (2007) 5-10.

De Amorim, F.R., Franco, M.B., Nascentes, C.C., Da Silva, J.B.B. Direct Determination of Molybdenum Food Samples Using Slurry Sampling and Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. *Food anal. Methods*, 4 (2011) 41 – 48.

De Lemos, L. R., Patrício, P. D., Rodrigues, G. D., De Carvalho, R. M. M., Da Silva, M. C. H., Da Silva L. H. M. Liquid-liquid equilibrium of aqueous two-phase systems composed of poly(ethylene oxide) 1500 and different electrolytes ((NH₄)₂SO₄, ZnSO₄ and K₂HPO₄): experimental and correlation, *Fluid Phase Equilib.* 305 (1) (2011) 19–24.

De La Calle, I., Cabaleiro, N., Romero, V., Lavilla, I., Bendicho, C. Sample pretreatment strategies for total reflection X-ray fluorescence analysis: A tutorial review, *Spectrochim. Acta B* 90 (2013) 23-54.

De Keukeleire, D. Fundamentals of beer and hop chemistry. *Química nova*, 23 (2000) 108-112.

De Stefano, A., Montanari, L. Minor components of beer: a review, *Alcologia* 8 (1996) 43–45.

Dhara, S., Misra, N. L., Thakur, U. K., Shah, D., Sawant, R. M., Ramakumar, K. L., Aggarwal, S. K. A total reflection X-ray fluorescence method for the determination of chlorine at trace levels in nuclear materials without sample dissolution, *X-Ray Spectrom.*, 41 (2012) 316–320.

D'Illio, S., Petrucci, F., D'Amato, M. Di Gregorio, O. Senofonte, N. Violante. 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*, 624 (2008) 59–67.

Duarte, A.C. Elemental analysis for categorization of wines and authentication of their certified brand of origin. *J Food Compos Anal* 24 (2011) 548–562.

Draper, N., Smith, H. *Applied regression analysis*, Wiley, New York, 1998.

Durbin, J., Watson, G.S. Testing for serial correlation in least squares regression II, *Biometrika* 38 (1951) 159.

El Sayeda, E.M., Hamed, A.M., Badran S.M., Mostafa, A.A. A survey of selected essential and heavy metals in milk from different regions of Egypt using ICP-AES. *Food Additives and Contaminants: Part B*, 4 (2012) 294–298.

Enb, A., Abu Donia, M. A., Abd-Rabou, N. S., Abou-Arab, A. A. K. and El-Senaity, M. H. Chemical composition of raw milk and heavy metals behavior during processing of milk products, *Global Veterinaria* 3 (2009) 268-275.

Enciclopédia Britânica on-line, 2009. <https://www.britannica.com/topic/wine>. Acessado em 26/11/2017.

Espinoza-Quiñones, F. R. , Módenes A. N., Palácio S. M., Lorenz E. K., A.P. Oliveira, Analysis of metal concentration levels in water, sediment and fish tissues from Toledo municipal lake by applying SR-TXRF technique, *Water Sci. Technol.* 63 (2011) 1506–1512.

Espanha - Real Decreto 53 Reglamentación Técnico-Sanitaria para la Elaboración, Circulación y Comercio de la Cerveza y la Malta Líquida, BOE34, 1995.

European Union Council Decision No. 2455/2001/EC establishing the list of priority substances in the field of water policy amending Directive 2000/60/EC, *Official Journal of the European Union*, p. 3311, 2001.

EC (European Commission). Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of

analytical methods and the interpretation of results. Official Journal of the European Communities, (2002), L 221/8.

Farajzadeh, M.A.; Bahram, M.; Zorita, S.; Mehr, B.G. Optimization and application of homogeneous liquid-liquid extraction in preconcentration of copper (II) in a ternary solvent system. *J. Hazard. Mater.* 161 (2009) 1535.

Fernandez-Calvino, D., Rodriguez-Suavez, J.A., Lopez-Periago, E., M. Arias-Estevez, M., Simal-Gandara, J. Copper content of soils and river sediments in a winegrowing area and its distribution among soil or sediment components *Geoderma*, 145 (2008), pp. 91-97.

Ferreira, A.B.H. Novo dicionário da língua portuguesa. 2.^a edição. Rio de Janeiro. Nova Fronteira. p. 385, 1986..

Fiket, Z., Mikac, N., Kniewald, G. Arsenic and other trace elements in wines of eastern Croatia *Food Chemistry*, 126 (2011), pp. 941-947.

Filik, H., Giray D. Cloud point extraction for speciation of iron in beer samples by spectrophotometry. *Food Chemistry*, 130 (2012) 209-213.

Frazzoli, C.; Bocca, B.; Validation, uncertainty estimation and application of a sector field ICP MS-based method for As, Cd and Pb in cow's milk and infant formulas. *Microchimica Acta*, 162 (2008) 43.

Galani-Nikdakaki, S., Kallithrakas-Konos, N., Katsanos, A. A. Trace element analysis of Cretan wines and wine products, *The Science of the Total Environment* 285 (2002), pp.155–163.

Georgieva, R., Detcheva A., Karadjov M., Jordanov J., Ivanova E. Total reflection X-ray fluorescence analysis of trace elements in Bulgarian bottled mineral waters of low and high mineral content, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 93 (2013) 1043–1051.

Ghaedi M., Fathi M. R., Shokrollahi A., F. ShajaratF. Highly selective and sensitive preconcentration of mercury ion by cold vapor atomic absorption spectroscopy. *Anal Lett* 39 (2006) 1171.

Global Beer Consumption by Country in 2015. Tóquio: Kirin Holdings, 2016. Disponível na Internet: <http://www.kirinholdings.co.jp/english/news/2016/1221_01.html>. Acesso em: 12/Abr/2017.

Góes, F.J. Desenvolvimento e otimização do processo fermentativo para a produção do vinho branco a partir da uva Itália. 2005. 157 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)–Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2005.

Goldberg, D. M., Bromberg, I. L. Health effects of moderate alcohol consumption: a paradigmatic risk factor, *Clinica Chimica Acta* 246 (1996), pp.14–16.

Gonçalves, Jr. A.C; Selzein C.; Nacke, H. Uso de biomassa seca e aguapé (*Eichornia crassipes*) visando à remoção de metais pesados tóxicos de soluções contaminadas. *Acta Scient Technol*, 31 (2009) 103-108.

González-Montaña, J.R., Enrique Senís, E. Gutiérrez, A., Prieto F. Cadmium and lead in bovine milk in the mining area of the Caudal River (Spain). *Environ Monit Assess*, 184 (2012) 4029–4034.

Goyer R. A. Toxic effects of metals. In: KLAASSEN, C.D. Casarett & Doull's Toxicology: the basic science of poisons. 5. ed. New York: MacGraw Hill, (1996). p. 691-736.

Graber, T.A.; Andrews, B.A.; Asenjo, J.A. Model for the partition of metal ions in aqueous two-phase systems. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci*, 743 (2000), 57.

Grant, C.N., Dennis H.T., Antoine J.M.R., Hoo-Fung L.A., Lalor G.C., Agglomerative hierarchical clustering analysis of twenty-six rice samples analysed by instrumental neutron activation analysis and other techniques, *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 297 (2013) 233–239.

Gronbaek, M., Deis, M., Sorensen, T.I., Becker, U., Schnohr, P. Jensen, P. Mortality associated with moderate intakes of wine, beer or spirits, *British Medical Journal*, 10 (1995) 1165–1169.

Gruber, X., Kregsamer, P., Wobrauschek, P., Strelci, C. Total-reflection X-ray fluorescence analysis of Austrian wine *Spectrochim. Acta B At. Spectrosc.*, 61 (2006) 1214-1218.

Guimarães, D., Carvalho, M. L., Becker, M., A. Von Bohlen, Geraldes, V., Rocha, I., Santos, J. P. Lead concentration in feces and urine of exposed rats by X-ray fluorescence and electrothermal atomic absorption spectrometry. *X-Ray Spectrom.* 41 (2012) 80–86.

Hammer D., Nicolas M., Andrey D. Improved chromium determination in various food matrices using dynamic reaction cell ICP-MS. *Atomic Spectroscopy* 26 (2005) 203.

Haraguchi, L. H.; Mohamed, R. S.; Loh, W.; Pessôa Filho, P. A. Phase equilibrium and insulin partitioning in aqueous two-phase systems containing block copolymers and potassium phosphate. *Fluid Phase Equilibria.* 215 (2004) 1-15.

Harris, D. C. *Análise Química Quantitativa*. Sexta edição, W.H. Freeman and Company, New York, 2003.

Haswell, S. J., Walmsley, A. D. Multivariate data visualisation methods based on multi-elemental analysis of wines and coffees using total reflection X-ray fluorescence analysis *J. Anal. At. Spectrom.*, 13 (1998), pp.131-134.

Hatori N., Imura H., Ohashi A., Ohashi K. Solid-phase extraction of Gallium(III) with hydrophobic 8-Quinolinol derivatives-impregnated resin from aqueous acidic and alkaline solutions, *Anal. Sci.* 24 (12) (2008) 1637–1641.

He Q., Chang X., Huang X., Hu Z. Determination of trace elements in food samples by ICP-AES after preconcentration with p-toluenesulfonylamide immobilized on silica gel and nanometer SiO₂. *Microchim Acta* 160 (2008)147.

Hornsey, I. S. *A history of beer and brewing*, Cambridge, Royal Society of Chemistry, 2003.

Horwitz W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method performance studies. *Pure Appl Chem*, 67 (1995) 331- 43.

Imperato, M., Adamo, P., Naimo, D., Arienzo, M., Stanzione, D., Violante, P. Spatial distribution of heavy metals in urban soils of Naples city (Italy). *Environmental Pollution*, 124 (2003) 247–256.

INMETRO. DOQ-CGCRE-008: Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Revisão 02, 2007.

INMETRO. DOQ-CGCRE-08: Orientação sobre validação de métodos de ensaio químico. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Revisão 04, 2011.

Ivanova-Petropulos, V., Jakabová S., Nedelkovski D., Vladimír Pavlík V., Balážová Z., Hegedús O. Determination of Pb and Cd in Macedonian Wines by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry (ETAAS). *Food Anal. Methods*, 8 (2015) 1947–1952.

Jiangfeng, P., Jian, W., Yibin, Y. Determination of trace heavy metals in milk using an ionic liquid and bismuth oxide nanoparticles modified carbon paste electrode. *Chinese Science Bulletin*, 57 (2012) 1781 – 1787.

Corominas, J. Breve diccionario etimológico de la lengua castellana, 3^o ed. muy revisada y mejorada, Madrid, 1987, verbete "cerveza".

Keukelerie, D. Fundamentals of beer and hop chemistry, *Quím. Nova* 23 (2000) 108-112.

Klockenkämper, R., Von Bohlen, A. Elemental Analysis of Environmental Samples by Total Reflection X-Ray Fluorescence: a review, *X-Ray Spectrom.* 25 (1996) 156-162.

Kment, P., Mihaljevic, M., Ettler, V., Sebek, O., Strnad, L., Rohlava, L., Differentiation of Czech wines using multielement composition. *Food Chemistry* 91 (2005) 157–165.

Kondo, K. Preventive effects of dietary beer on lifestyle-related diseases. *EBC Proc.*, Dublin, n. 1, p.133, 2003.

Kostic, D., Mitic, S, Miletic, G., Despotovic, S., Zarubica, A. The concentrations of Fe, Cu and Zn in selected wines from South-East Serbia *Journal of the Serbian Chemical Society*, 75 (2010) 1701-1709

Kula, M.R.; Kroner, K.H.; Husted, H.; Schutte, H.A. Technical aspects of extractive enzyme purification. *N.Y. Acad. Sci.*, 369, 341, 1981.

Lacerda, V.G., Mageste A.B., Santos I.J. B., Da Silva L.H.M., Da Silva M.C.H. Separation of Cd and Ni from Ni–Cd batteries by an environmentally safe methodology employing aqueous two-phase systems, *J. Power Sources* 193 (2) (2009) 908–913.

La Pera, L., Dugo, G., Rando, R., Bella, G.D., Maisaho, R., Salvo, F. Statistical study of the influence fungicide treatments (mancozeb, zoxamide and copper oxychloride) on heavy metal concentrations in Sicilian red wine. *Food Additives and Contaminants: Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 25(2008) 302-313.

Leite F. *Validação em Análise Química*. Editora Átomo, 5ª ed. Campinas – SP

Lemos, V.A., De la Guardia, M., Ferreira, S.L. An on-line system for preconcentration and determination of lead in wine samples by FAAS, *Talanta* 58 (2002), pp.475–480.

Lemos, V.A., Santos, E.S., Gama E.M. A comparative study of two sorbents for copper in a flow injection preconcentration system. *Separation and Purification Technology*, 56 (2007) 212-219.

Lemos, V.A., David, G.T. An on-line cloud point extraction system for flame atomic absorption spectrometric determination of trace manganese in food samples. *Microchemical Journal (Print)*, 94 (2010) p. 42-47.

Lemos, L.R. et al. Copper recovery from ore by liquid-liquid extraction using aqueous two-phase system. *Journal of Hazardous Materials*, 237 (2012) 209-214.

Lemos, L.R., Campos, R.A., Rodrigues, G.D., Da Silva, L.H.M., Silva, M.C.H. Green separation of copper and zinc using triblock copolymer aqueous two-phase systems. *Separation and Purification Technology*, 115 (2013) 107-113.

Levene, H. In *Contributions to probability and statistics*; Olkin, I.; Ghurye, S. G.; Hoeffding, W.; Madow, W. G.; Mann, H. B.; eds.; Stanford University Press: Stanford, (1960).

Licata, P., Trombeta, D., Cristani, M., Giofre, F., Martino, D., Calo, M., Naccari, F., 2004. Levels of toxic and essential metals in samples of bovine milk from various dairy farms in Calabria, Italy. *Environment International*, 30, 1-6.

Liu, L., Ding, L., Qi, M., Han, X. L., Zhang, H. Q. Determination of trace elements in new food sources by flame atomic absorption spectrophotometry. *Spectrosc Spect Anal* 27 (2007) 1436.

Li, Y., Van Loon, J. C., Barefoot, R. R. Preconcentration of trace elements in potable liquids by means of a liquid membrane emulsion for flame atomic absorption determination, *Fresenius J. Anal. Chem.* 345 (1993) 467– 470.

Li, Y., Mccrory, D. F., Powell, J. M., Saam, H., & Jackson-Smith, D. (2005). A survey of selected heavy metal concentrations in wisconsin dairy feeds. *Journal of Dairy Science*, 88 (2005) 2911–2922.

Lobiński, R., Szpunar-Lobińska, J., Adams, F. C., Teissedre, P. L., Cabanis, J. C. Speciation analysis of organolead compounds in wine by capillary gas chromatography/microwave-induced plasma atomic emission spectrometry, *Journal of AOAC International* 76 (1993) 1262–1267.

Loska, K., Wiechula, D., Korus, I. Metal contamination of farming soils affected by industry. *Environment International*, 30 (2004) 159–165.

Lurie, J. *Handbook of Analytical Chemistry*, Mir Publishers, Moscow, 1975.

Maas, S., Lucot, E., Gimbert, F., Crini, N., Badot, P. M. Trace metals in raw cows' milk and assessment of transfer to Comté cheese. *Food Chemistry*, 129 (2011) 7–12.

Malavolta, M., Piacenza F., Basso A., Giacconi R., Costarelli L., Pierpaoli S., Mocchegiani E. Speciation of trace elements in human serum by micro anion exchange chromatography coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Biochem* 421 (2012)16–25.

Malhat, F., Hagag M., Saber A., Fayz, A. E. Contamination of Cows Milk by Heavy Metal in Egypt. *Bull Environ Contam Toxicol*, 88 (2012) 611–613.

MAPA. Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários, Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento (MAPA), Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília, Mapa/ACS, (2011).

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 259, de 31 de maio de 2010. Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil. Brasília, DF, Seção 1,02 junho 2010. p. 7.

Marçal, W.S.; Campos N.O.; Nascimento, M.R.L. Valores sanguíneos de chumbo em bovinos nelore suplementados com sal mineral naturalmente contaminado por chumbo. *Ciência Rural*, Santa Maria, 28 (1988) 53-57.

Marguí, E., Marques, A. F., Prisal, M.L., Hidalgo M., Queralt I., Carvalho M.L. Total reflection X-ray spectrometry (TXRF) for trace elements assessment in edible clams, *Appl. Spectrosc.* 68 (2014) 1241–1246.

Marisa, C., Almeida, R., Teresa, M., Vasconcelos, S. D., Barbaste, M., Medina, B. ICP-MS multi-element analysis of wine samples – a comparative study of the methodologies used in two laboratories. *Anal Bioanal Chem*, 374 (2002) 314–322.

Markert, B., Friese, K. Trace elements—Their distribution and effects in the environment (1st Ed.). Oxford: Elsevier (2000).

Martinez, T., Lartigue J., Zarazua G., Avila-Perez P., Navarrete M. , Tejeda S. Total reflection X-ray fluorescence analysis of trace-elements in candies marketed in Mexico, *Spectrochim. Acta Part B* 65 (2010) 499–503.

Martins, J.P., Carvalho, C.P., Da Silva, L.H.M., Coimbra, J.S.R., Da Silva, M.C.H., Rodrigues, G.D., Minim, L.A. Liquid–Liquid Equilibria of an Aqueous Two-Phase System Containing Poly(ethylene) Glycol 1500 and Sulfate Salts at Different Temperatures *J. Chem. Eng.*, 53 (2008) 238-241.

- Matusiewicz, H. Wet digestion methods. In: Mester, Z, Sturgeon, R (eds) Sample preparation for trace elements analysis, vol XLI. Elsevier, Amsterdam, (2003) 193–233.
- Merdivan, M., Yilmaz, E., Hamamci, C., Aygun, R.S. (2004). Basic nutrients and element contents of white cheese of Diyarbakır in Turkey. Food Chemistry, 87 (2004) 163–171.
- Midio, A. F.; Martins, D. I. Toxicologia de alimentos. São Paulo: Varela, 295 p, 2000.
- Mochaba, F., O'Connor-Cox, E.S.C., Axcell, B.C. Effects of yeast quality on the accumulation and release of metals causing beer instability, J. Am. Soc. Brew. Chem. 54 (1996). 164–171.
- Moraes, V., Locatelli, C. Vinho: uma revisão sobre a composição química e benefícios à saúde. Evidência, Joaçaba 10 (2010) 57-68.
- Moreno, I.M., Weiler, D.G., Gutierrez, V., Marino, M., Camean, A.M., Gonzales, A.G. Differentiation of two Canary DO red wines according to their metal content from inductively coupled plasma optical emission spectrometry and graphite furnace atomic absorption spectrometry. Talanta 72 (2007) 263–268.
- Nascentes, C.C., Kamogawa, M.Y., Fernandes, K.G., Arruda, M.A.Z., Nogueira, A.R.A. Nóbrega, J.A. Direct determination of Cu, Mn, Pb and Zn in beer by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry, Spectrochim. Acta. B 60 (2005) 749-753.
- Natasha Aguiar Rosa e Júlio Carlos Afonso. A química da cerveja. Química Nova na Escola 37 (2015) 98-105.
- Najamezhad, V., Akbarabadi, M. Heavy metals in raw cow and ewe milk from north-east Iran Food Additives & Contaminants; Part B, 3 (2013) 158-162.

Nam, S.H., Cheng, J., Mindak, W.R., Capar S.G. Preliminary results of extraction, separation and quantitation of arsenic species in food and dietary supplements by HPLC-ICP-MS. *Bull Korean Chem Soc.* 27 (2006) 903.

Naozuka, J., Vieira, E.C., Nascimento, A.N., Oliveira, P.V. Elemental analysis of nuts and seeds by axially viewed ICP OES. *Food Chem.* 124 (2011) 1667–1672.

Necemer, M., Kosir, I.J., Kump, P., Kropf, U., Jamnik, M., Bertoneceli, J., Ogrinc, N., Golob, T. Application of total reflection X-ray spectrometry in combination with chemometric methods for determination of the botanical origin of Slovenian honey, *J. Agric. Food Chem.* 57(2009) 409–414.

OIV – International Organisation of Vine and Wine. Maximum Acceptable Limits of Various Substances Contained in Wine OIV-MA-C1-01: R2011, 1–3. <http://www.oiv.int/public/medias/2601/oiv-ma-c1-01.pdf> (2011). Acessado em 01/03/2018.

Oliveira, M.C., Abreu, F.M.A.N; Pessoa, F.P.A. Phase equilibrium and protein partitioning in aqueous two-phase systems containing ammonium carbamate and block copolymers PEO-PPO-PEO. *Biochemical Engineering Journal*, 37 (2007) 311-318.

Oszmianski, J., Cheynier, V., Mountounet, M. Iron-catalyzed oxidation of (+) catechin in model system, *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 44 (1994) 712–715.

Patz, C.D., Cescutti C., Dietrich H., Andlauer W. Manganese screening of pineapple by total-reflection X-ray fluorescence (TXRF) spectroscopy, *Dtsch. Lebensmitt. Rundsch.* 109 (2013) 315–319.

Pandya, A.; Ghodke, K. Goat and sheep milk products other than cheeses and yoghurt. *Small Ruminant Research*, 68 (2007) 193–206.

Patrício, P.R.; Mesquita, M.C.; Da Silva, L.H.M.; Da Silva, M.C.H. Application of aqueous two-phase systems for the development of a new method of cobalt(II), iron(III) and nickel(II) extraction: a green chemistry approach. *Journal of Hazardous Materials*. 193 (2011) 311-318.

Penna, N. G., Hecktheuer, L. H. R. Vinho e Saúde: uma revisão. *Infarma* 16 (2004) 64-67.

Pereira, M.D., Arruda, M.A.Z. Trends in preconcentration procedures for metal determination using atomic spectrometry techniques, *Microchim Acta*, (2003) 141-115.

Pessanha, S., Carvalho, M.L., Becker, M., Bohlen, A. Quantitative determination on heavy metals in different stages of wine production by Total Reflection X-Ray Fluorescence and Energy Dispersive X-Ray Fluorescence: Comparison on two vineyards. *Spectrochimica Acta Part B Atomic Spectroscopy* 65 (2010) 504-507.

Pilarczyk, R., Wójcik, J., Czerniak, P., Sablik, P., Pilarczyk, B., Tomza-Marciniak, A. Concentrations of toxic heavy metals and trace elements in raw milk of Simmental and Holstein-Friesian cows from organic farm. *Environ Monit Assess*, 185 (2013) 8383–8392.

Pohl, P., Prusisz, B. Pre-concentration of Cd, Co, Cu, Ni and Zn using different off-line ion exchange procedures followed by the inductively coupled plasma atomic emission spectrometric detection, *Anal. Chim. Acta* 502 (2004) 83–90.

Pohl, P. Determination and fractionation of metals in beer: A review. *Food Addit. Contam.* 25 (2008) 693–703.

Pohl, P., Prusisz, B. Chemical fractionation of Cu, Fe and Mn in canned Polish beers. *Journal of Food Composition and Analysis*. *Journal of Food Composition and Analysis*. 23 (2010) 86-94.

Preedy, V.R. Beer in Health and Disease Prevention, First edition, London, Academic Press, London, UK (2008).

Pyrzynska, K. Analytical Methods for the Determination of Trace Metals in Wine. *Analytical Chemistry*, 34 (2004) 69-83.

Quináia, S.P.; Nóbrega, J.A. Determinação direta de Cr em açúcar e leite por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite. *Química Nova*, 23 (2000) 185-190.

Resende, L.V., Nascentes, C.C. A simple method for the multi-elemental analysis of organic fertilizer by slurry sampling and total reflection X-ray fluorescence, *Talanta*, 147 (2016) 485-492.

Ribeiro, F.A. de L., Ferreira M.M.C. Planilha de Validação: Uma Nova Ferramenta para Estimar Figuras de Mérito na Validação de Métodos Analíticos Univariados. *Química Nova*, 31(2008) 164-171.

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D. *Handbook of Enology: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*. 2. ed. England: John Wiley & Sons, v. 2 (2006).

Rodrigues, G.D., Da Silva, M.C.H., Da Silva, L.H.M., Jurgensen Paggiolli F., Minim L.A., Dos Reis Coimbra J.S. Liquid-liquid extraction of metal ions without use of organic solvent, *Sep. Purif. Technol.* 62 (2008) 687–693.

Rodrigues, S.M., Otero, M., Alves, A.A., Coimbra, J., Coimbra, M.A., Pereira E., Duarte A.C. Elemental Analysis for categorization of wines and authentication of their certified brand of origin. *Journal of Food Composition and Analysis* 24 (2011) 548 – 562.

Rodrigues, G.D., De Lemos, L.R., Da Silva, L.H. M., Da Silva, M.H.H. Monosegmented flow analysis exploiting aqueous two-phase systems for the determination of cobalt, *Anal. Sci.* 28 (2012) 1213–1218.

Rodrigues, G.D. Desenvolvimento e aplicação de novos sistemas aquosos bifásicos para determinação e separação de metais. Tese de Doutorado, Programa de Pós-graduação em Agroquímica, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil, 2012.

Rodrigues, G.D., De Lemos, L.R., Patricio, P.D., Da Silva, L.H.M., Da Silva, M.D. H. Aqueous two-phase systems: a new approach for the determination of paminophenol, *J. Hazard. Mater.* 192 (2011) 292–298.

Rahimi, E. Lead and cadmium concentrations in goat, cow, sheep, and buffalo milks from different regions of Iran, *Food Chemistry* 136 (2013) 389–391.

Rogers, R.D.; Bond, A.H.; Bauer, C.B. The crown ether extraction of group 1 and 2 cations in polyethylene glycol-based aqueous biphasic systems at high alkalinity. *Pure Appl. Chem.* 65 (1993) 567.

Rogers, R.D.; Bond, A.H.; Bauer, C.B.; Zhang, J.; Jezl, M.L.; Roden, D.M.; Rein, S.D.; Chomko, R.R.; Rogers, R.D. (editor); EITEMAN, M.A. (editor). *Aqueous biphasic separations: biomolecules to metal ion. Plenum Press.* London, 1995.

Rogers, R.D., Bond, A.H., Bauer, C.B., Zhang, J., Griffin, S.T. Metal ion separations in polyethylene glycol-based aqueous biphasic systems: correlation of partitioning behaviour with available thermodynamic hydration data, *J. Chromatography. B* 680 (1996) 221–229.

Rosa, N. A., Afonso, J. C. A Química da Cerveja. *Química Nova Escola*, 37 (2015) 98-105.

Ryan, T. A., Joiner, B. L. Normal probability plots and tests for normality, The State College: Pennsylvania State University, 1976.

Sadeghi, S., Sheikhzadeh, E. Solid phase extraction using silica gel modified with murexide for preconcentration of uranium (VI) ions from water samples. *Journal of Hazardous Materials*, 163 (2009) 861–868.

Salma, I., Maenhaut, W., Dubtsov, S., Papp, É. Z., & Záray, G. (2000). Impact of phase out of leaded gasoline on the air quality in Budapest. *Microchemical Journal*, 67, 127–133.

Santos, P.S. Os primórdios da cerveja no Brasil. São Paulo, Ateliê Editorial, 2003.

Santos, L.G.C., Fernandes, E.A. de N.; Bacchi, M.A. Sarries, G.A.; Blumer, L. Barbosa Junior, F. Chemical composition of bovine milk from Minas Gerais State, Brazil. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 282 (2009) 493.

Santos, L.H. Separação de níquel a partir de soluções sulfúricas contendo cálcio e magnésio utilizando-se sistemas aquosos bifásicos. Dissertação – Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais. 2014.

Sautter, C.K. et al. Determinação de resveratrol em sucos de uva no Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25 (2005) 437-442.

Shirley, R.L. Water requirements for grazing ruminants and water as source of minerales. In: Mcdowell, L.R. Nutrition of grazing ruminants in warm climates. Orlando: Academic Press, (1985) 182 – 186.

Shibukawa M., Nakayama N., Hayashi T., Shibuya D., Endo Y., Kawamura S. Sulphate two-phase systems in the presence of iodide and thiocyanate ions, *Anal. Chim. Acta* 427 (2001) 293–300.

Silva, R.M.C., Almeida, E., Valencia, E.P.E., Filho, V.F.N. Determination of Fe, Cu and Zn in sugar-cane spirits commercialized in Southeastern Brazil by TXRF, *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 260 (2004) 3–7.

Silva, P.H.A.; Faria, F.C. Avaliação da intensidade de amargor e do seu princípio ativo em cervejas de diferentes características e marcas comerciais. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28 (2008) 902-906.

Silver, H.K.; Kempe, C.H.; Bruyn, H.B. *Manual de Pediatria*; 10^a ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1975.

Silvestre, M.D; Lagarda, M.J. Farré, R.; Matínez-Costa, C.; Brines, J. Cooper, iron and zinc determinations in human milk using FAAS with microwave digestion. *Food Chemistry*, 68 (2000) 95.

Siqueira, P. B., Bolini, H. M. A., Macedo, G. A. O processo de fabricação da cerveja e seus efeitos na presença de polifenóis. *Alimentos e Nutrição*, 19 (2008) 491-498.

Smagunova, A. N., Pashkova, G. V. Choice of optimal conditions for X-ray fluorescence analysis of milk products with varying fat content, *X-Ray Spectrom.* 42 (2013) 546–551.

Souza, S.V.C.; Junqueira, R.G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Analytica Chimica Acta*, 552 (2005) 25-35.

Souza, G.G., Meneghin, L.O., Coelho, S.P., Maia, J.F., Silva, A.G. A uva roxa, *Vitis vinífera L. (Vitaceae)* – seus sucos e vinhos na prevenção de doenças vasculares. *Natureza on-line* 4 (2006) 80-86.

Souza, S.V.C. Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos. Tese – Escola de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.

Souza, S.N.P.; Nascentes, C.C.; Costa, L.M. Validation of a microwave assisted digestion procedure of pate samples using diluted HNO₃ for Fe and Zn determination by FS FAAS. *Analytical Methods*, 5 (2013) 6411-6415.

Souza, S.N.D.P.E. Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de Cd, Cu, Fe, Pb e Zn em amostras de patês por espectrometria de absorção atômica. Tese - Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, 2014.

Scolary, G.R. Metals in wine: contamination, spoilage and toxicity, *Analysis* 25 (1997) 26–30.

Stafilov, T., Karadjovaz, I. Atomic Absorption Spectrometry in Wine Analysis – A Review - *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 28 (2009) 17-31

Stosnach, H. Analytical determination of selenium in medical samples, staple food and dietary supplements by means of total reflection X-ray fluorescence spectroscopy, *Spectrochim. Acta Part B* 65 (2010) 859–863.

Tariba, B. Metals in wine-impact on wine quality and health outcomes. *Biological Trace Elements Research*, 144 (2011) 143-156.

Teissedre, P. L., Lobiński, R., Cabanis, M. T., Szpunar-Lobińska, J., J. C. Cabanis, J. C., Adams, F. C. On the origin of organolead compounds in wine, *The Science of the Total Environment* 153 (1994), pp.247–252.

Tripathi, M., Raghunath, R., Sastry, N., Krishnamoorthy, M. Daily intake of heavy metals by infants through milk and milk products. *Sci Total Environ.* 227 (1999) 229–235.

Tyler, G. ICP MS, or ICP AES and AAS? A comparison - *ICP-MS Instruments at work. Varian. ICP-MS 1*, Abril, 1994.

Vandecasteele, C. Modern Methods for trace element determination. Chichester: Ed. John Wiley; Sons, 1993.

Vinas, P., Aguinaga, N., Lopez-Garcia, I., Hernandez-Cordoba, M. Determination of cadmium, aluminium, and copper in beer and products used in its manufacture by electrothermal atomic absorption spectrometry, J. AOAC Internat. 85 (2002) 736–743.

Vincevica-Gaile, Z., Klavins M., Rudovica V., Viksna A. Research review trends of food analysis in Latvia: major and trace element content, Environ. Geochem. Health 35 (2013) 693–703.

Vogt, E. El vino: obtencion, elaboracion y analisis. 2. ed. Zaragoza: Acribia, 1986.

Voica, C., Magdas, D., Feher, I. Metal Content and Stable Isotope Determination in Some Commercial Beers from Romanian Markets, J. Chem., (2015) 1-10.

Volynskii, A.B. Chemical Modifiers in Modern Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. Journal of Analytical Chemistry, 58 (2003) 905.

Volynskii, A.B. Comparative efficacy of platinum group metal modifiers in electrothermal atomic absorption spectrometry. Spectrochimica Acta Part B, 59 (2004)1799.

Vystavna, Y., Rushenko L., Diadin D., Klymenko O., Klymenko M. Trace metals in wine and vineyard environment in southern Ukraine. Food Chemistry 146 (2014) 339–344.

Walsh, M. C. Moving from official to traceable methods. Trends in Analytical Chemistry, 18 (1999) 616-623.

Watson, C.A. Official and Standardized Methods of Analysis, third ed., Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1994, 688– 689.

Weissler, H.E. Quality control, in Handbook of Brewing, W. A. Hardwick, Ed. Marcel Dekker, New York, NY, USA, 1995.

Wobruschek, P. Total reflection x-ray fluorescence analysis-a review. X- Ray Spectrom. 36 (2007) 289-300.

Wolf, R.E. Introduction to ICP-MS. What is ICP-MS?... and more importantly, what can it do? U.S. Geological Survey Home Page, USGS/CR/CICT, Março 2005. Disponível em <<http://minerals.cr.usgs.gov/icpms/intro.html>>. Data de acesso: 11/02/2016.

World Health Organization,WHO Guidelines for Drinking-Water Quality, First Addendum to Third Edition, Recommendations, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2006.

Xiang, G., Wen, Sh., Wu, X., Jiang, X., He, L., Liu, Y. Selective cloud point extraction for the determination of cadmium in food samples by flame atomic absorption spectrometry, Food Chemistry 132 (2012) 532–536.

Xie, K.; Huang, K.; Xu, L.; Yu, P.; Yang, L.; Liu, H. Three-liquid-phase extraction and separation of Ti(IV), Fe(III) and Mg(II). *Ind. Eng. Chem. Res.*, v.50, p.6362, 2011.

Young, T.W.: Na Enciclopédia Britânica on-line, 2009. Disponível na Internet: <<https://www.britannica.com/topic/beer>>. Acesso em 03/ dezembro/2017.

Yoshikuni, N.; Baba, T.; Natsuki, T.; Oguma, K. Aqueous two-phase extraction of nickel dimethylglyoximate complex and its application to spectrophotometric determination of nickel in stainless steel. *Talanta*, 66 (2005).40.

Zaslavsky, B.Y. Aqueous Two-Phase partitioning, physical chemistry and bioanalytical applications. Marcel Dekker, New York, (1995).

Zhang, T.; LI, W.; Zhou, W.; Gao, H.; Wu, J.; Xu, G.; Chen, J.; Liu, H.; Chen, J. Extraction and separation of gold (I) cyanide in polyethylene glycol - based aqueous biphasic systems. *Hidrometallurgy*, 62 (2001) 41.

Zioła-Frankowska, A., Frankowski, M. Determination of Metals and Metalloids in Wine Using Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry and Mini-torch. *Food Analytical Methods*, 10 (2017)180-190.

Zvarova, T.I., Shkiney, V.M., Vorob'eva, G.A., Spirakov, B.Ya., Zolotov, A. Liquid-liquid extraction in the absence of usual organic solvents: Application of two-phase aqueous systems based on a water-soluble polymer. *Microchim. Acta* 84 (1984) 449-458.

Zufall, C. Tyrell, T. The influence of heavy metal ions on beer flavour stability, *J. I. Brewing* 114 (2008) 134–142.