

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Wesley Tinoco Esteves

**Metodologia para o controle de qualidade
e segurança do leite em relação à
presença de contaminantes inorgânicos**

JUIZ DE FORA

2014

Wesley Tinoco Esteves

**Metodologia para o controle de qualidade e
segurança do leite em relação à presença de
contaminantes inorgânicos**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós graduação em
Química, da Universidade
Federal de Juiz de Fora como
requisito parcial a obtenção do
grau de Mestre em Química.
Área de concentração: Química
Analítica

Orientador: Prof. Dr. Rafael Arromba de Sousa

JUIZ DE FORA

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Esteves, Wesley Tinoco.

Metodologia para o controle de qualidade e segurança do leite em relação à presença de contaminantes inorgânicos / Wesley Tinoco Esteves. -- 2014.

80 p. : il.

Orientador: Rafael Arromba de Sousa

Coorientador: Marcelo Bonnet Alvarenga

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química, 2014.

1. Contaminantes inorgânicos. 2. Leite. 3. ICP-AES. 4. Solubilização alcalina. 5. Preparo de amostras. I. Sousa, Rafael Arromba de, orient. II. Alvarenga, Marcelo Bonnet, coorient. III. Título.

Wesley Tinoco Esteves

**Metodologia para o controle de qualidade e
segurança do leite em relação à presença de
contaminantes inorgânicos**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós graduação em
Química, da Universidade
Federal de Juiz de Fora como
requisito parcial a obtenção do
grau de Mestre em Química.
Área de concentração: Química
Analítica

Aprovada em 02 de dezembro de 2014

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rafael Arromba de Sousa -Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Fábio Grandis Lepri
Universidade Federal Fluminense

Dr. Leônidas Paixão Passos
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Agradecimentos

Aos meus pais pelo amor, exemplo e suporte. A meus irmãos e familiares pelo encorajamento e apoio. À Larissa, pelo amor, companheirismo e paciência nos momentos de cansaço e dificuldade.

Aos grandes amigos Gustavo, Carol, Raquel e Maurício.

Ao Professor Rafael, pela orientação, amizade e, principalmente, pela grande disposição em ajudar, mesmo nos finais de semana. Sem tal disposição e ajuda, este trabalho certamente não se realizaria.

Aos Professores Marcone Augusto Leal de Oliveira e Maria Auxiliadora Costa Matos, pelas conversas, explicações e valiosas dicas.

Ao Dr. Humberto de Mello Brandão pelas sugestões e pelo auxílio na obtenção de amostras e a todos da equipe da EMBRAPA que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Ao Dr. Marcelo Bonnet Alvarenga.

*“O homem que compreende a
sua ignorância deu o primeiro
passo para o conhecimento”*

Max Heindel

Resumo

O presente trabalho buscou estabelecer um método para a determinação de contaminantes inorgânicos em leite cru que fosse compatível com aplicações em larga escala, como os programas regulatórios de monitoramento de contaminantes em leite. Para tal, foi proposta uma abordagem utilizando a técnica de espectrometria de emissão atômica em plasma (ICP-AES) sem mineralização das amostras, que foram solubilizadas em solução contendo etanolamina e ácido cítrico. Estudos foram conduzidos a fim de estabelecer condições instrumentais em que fosse possível utilizar o preparo amostral proposto mantendo o compromisso com a sensibilidade, exatidão e desempenho analítico necessários a fim de se atingir os limites de detecção requeridos por legislações relacionadas à segurança alimentar. A proporção ideal de diluição da amostra na solução de etanolamina e ácido cítrico foi de 1:2 (amostra:solução) e os valores mais adequados dos parâmetros instrumentais foram 1300W para a radiofrequência do plasma, $0,50\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ para a vazão do gás auxiliar e $0,60\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ para a vazão do gás de nebulização. Os limites de quantificação obtidos para Cd, Co, Cr, Cu e Pb foram, respectivamente, 6,54, 6,57, 14,8, 14,3 e $27,4\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Palavras-chave: Contaminantes inorgânicos. Leite. ICP-AES. Solubilização alcalina. Preparo de amostras.

Abstract

This study aimed to establish a method for the determination of inorganic contaminants in raw milk that was compatible with large-scale applications, such as regulatory programs for the monitoring of contaminants in milk. For this purpose, an approach using the technique of atomic emission spectrometry (ICP-AES) with no mineralization of the samples, which was solubilized in a solution containing ethanolamine and citric acid, has been proposed. Studies were conducted in order to establish experimental conditions in which it was possible to use the proposed sample preparation and keeping the commitment to sensitivity, accuracy and the analytical performance required by legislations related to food safety. The ideal ratio of sample dilution was 1:2 (sample:solution) and the most suitable values for instrumental parameters were 1300W for the plasma radiofrequency power, 0.50L.min⁻¹ for the flow of auxiliary gas and 0.60L.min⁻¹ for the flow of nebulizer gas. The quantification limits obtained for Cd, Co, Cr, Cu and Pb were, respectively, 6.54, 6.57, 14.8, 14.3 and 27.4 µg.mL⁻¹.

Keywords: Inorganic contaminants. Milk. ICP-AES. Alkaline solubilization. Sample preparation.

Lista de Figuras

1 Imagem do nebulizador utilizado no equipamento de ICP-AES.....	30
2 Imagem da câmara de nebulização utilizada no equipamento de ICP-AES	30
3 Diagrama do preparo de amostras para a determinação de contaminantes inorgânicos	31
4 Representações gráficas das matrizes de contorno (linha superior) e das superfícies de resposta (linha inferior) com diferentes combinações de variáveis.....	39
5 Superfície de resposta obtida para a robustez do plasma com a vazão do gás auxiliar fixada em $0,50 \text{ L.min}^{-1}$	41
6 Matrizes de contorno obtidas para cádmio com cortes otimizados para o maior valor de SBR	47
7 Superfícies de resposta obtidas para cádmio com cortes otimizados para o maior valor de SBR	48
8 Matrizes de contorno obtidas para cobalto com cortes otimizados para o maior valor de SBR	49
9 Superfícies de resposta obtidas para cobalto com cortes otimizados para o maior valor de SBR	50
10 Matrizes de contorno obtidas para cromo com cortes otimizados para o maior valor de SBR	51
11 Superfícies de resposta obtidas para cromo com cortes otimizados para o maior valor de SBR	52
12 Matrizes de contorno obtidas para cobre com cortes otimizados para o maior valor de SBR	53
13 Superfícies de resposta obtidas para cobre com cortes otimizados para o maior valor de SBR	54
14 Matrizes de contorno obtidas para chumbo com cortes otimizados para o maior valor de SBR	55
15 Superfícies de resposta obtidas para chumbo com cortes otimizados para o maior valor de SBR	56

16 Comparação de curvas analíticas aquosas e com sobreposição de matriz para os diferentes elementos e para diferentes proporções de diluição da amostra	60
17 Sistema de nebulização com a proporção (1:1) de diluição das amostras durante uma medida	63
18 Sistema de nebulização com a proporção (1:2) de diluição das amostras durante uma medida	63

Lista de Tabelas

1 Concentração dos principais constituintes minerais do leite	13
2 Estrutura do planejamento fatorial Box-Behnken utilizado para a otimização das condições instrumentais do equipamento de ICP-AES	36
3 Coeficientes da regressão linear para os termos avaliados no planejamento experimental.....	37
4 Valores dos parâmetros instrumentais escolhidos com base nos valores de \hat{y} obtidos na Equação 1.....	42
5 Estrutura do planejamento fatorial utilizado para estabelecer as condições ótimas do preparo de amostra	43
6 Coeficientes da regressão linear para os termos avaliados no planejamento experimental para otimização do preparo de amostra	45
7 Diferenças relativas entre as curvas analíticas aquosas e com sobreposição de matriz obtidas para diferentes proporções de diluição da amostra	62
8 Níveis de concentração utilizados para obtenção das curvas analíticas para cada elemento.....	64
9 Parâmetros avaliados de curvas analíticas obtidas para algumas linhas de emissão	65
10 Parâmetros avaliados de curvas analíticas obtidas para algumas linhas de emissão utilizando Y (371,029nm) a uma concentração de 65,95 ng.mL ⁻¹ como padrão interno.....	66
11 Valores médios de recuperação obtidos para os elementos com diferentes linhas de emissão e com a utilização ou não de padrão interno	69
12 Desvios relativos percentuais encontrados para cada elemento em vinte medidas no nível 3 da curva analítica.....	71

Lista de Abreviações

AOAC	International Association of Official Analytical Chemists
BB	Box-Behnken
CC	Composto central
DR	Diferença relativa
ICP-AES	Espectrometria de emissão atômica em plasma indutivamente acoplado (do inglês <i>Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry</i>)
ICP-MS	Espectrometria de massa com fonte de plasma
LDM	Limite de detecção do método
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MRC	Material de referência certificado
NIST	National Institute of Standards and Technology
PF	Polícia Federal
PI	Padrão interno
PNCRC	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
RBQL	Rede Brasileira de Qualidade do Leite
SBR	Razão sinal ruído (do inglês <i>Signal-to-Background Ratio</i>)
SolEtAc	Solução de etanolamina e ácido cítrico
TOC	Carbono orgânico total (do inglês <i>Total Organic Carbon</i>)

Sumário

1	Introdução.....	13
1.1	Importância do leite e seu contexto sócio econômico	13
1.2	Qualidade e segurança do leite	15
1.3	“Metais Pesados”	18
1.3.1	“Metais pesados” no meio ambiente.....	18
1.3.2	“Metais pesados” no leite	19
1.4	Métodos para determinação de contaminantes inorgânicos em leite	21
1.5	Preparo de amostras para determinação de contaminantes inorgânicos em leite.....	23
1.6	Contexto de execução do projeto.....	27
2	Objetivos.....	28
2.1	Objetivo geral.....	28
2.2	Objetivos específicos	28
3	Parte experimental	29
3.1	Materiais e reagentes	29
3.2	Instrumentação	29
3.3	Metodologia analítica	30
3.3.1	Preparo de amostra	30
3.3.2	Otimização das condições analíticas e validação	31
4	Resultados e discussão	33
4.1	Otimização instrumental - Estudo de robustez do plasma....	34
4.2	Estudo de variáveis do preparo de amostras.....	43
4.3	Avaliação de efeitos de matriz.....	59
4.4	Avaliação das linhas de emissão e da utilização de padrão interno	64
4.5	Estudos de exatidão.....	68
4.6	Estudos de precisão.....	71
5	Conclusões.....	72
	Referências	73
	Apêndice	80

1 Introdução

1.1 Importância do leite e seu contexto socioeconômico

O leite bovino e seus derivados apresentam uma grande importância na alimentação humana e um exemplo disso é o fato de que o seu consumo é uma recomendação nutricional para todas as faixas etárias¹. A Tabela 1 apresenta a concentração dos principais constituintes minerais do leite².

Tabela 1. Concentração dos principais constituintes minerais do leite. FONTE: LARSON (1985)

Mineral	Concentração mmol.L⁻¹
Sódio	25,2
Potássio	35,3
Cálcio	30,1
Magnésio	5,10
Fósforo inorgânico	22,3
Fosfato	3,40
Cloro	28,0
Citrato	10,6
Carbonato	2,00
Sulfato	1,00

Essa importância do leite na alimentação traz uma imensa responsabilidade ao governo e órgãos regulamentadores em garantir que o controle da qualidade do leite consumido seja efetivo e transparente, a fim de evitar riscos à sociedade e à credibilidade da indústria de lácteos.

Nesse contexto, vale ressaltar que na última década não foram raros os casos de adulteração de leite por grandes laticínios e

cooperativas agropecuárias, inclusive em Minas Gerais, que é um expressivo Estado produtor de leite.

Em 2007, alguns laticínios foram responsabilizados pela Polícia Federal por terem adquirido leite criminosamente adulterado de duas cooperativas, ambas em Minas Gerais³. Em 2010, um outro laticínio, que adulterava o leite com peróxido de hidrogênio, foi descoberto pela Polícia Federal (PF) após causar a intoxicação de crianças em uma creche⁴. Em 2011, uma outra cooperativa foi flagrada pela PF adulterando a composição de seu leite⁵.

Esses exemplos, dentre diversos outros ocorridos nos últimos anos, evidenciam a importância de um monitoramento mais intenso desse produto, de grande representatividade na alimentação.

Em nível internacional, a adição de melamina - um composto abundante em átomos de nitrogênio utilizado para aumentar os resultados de teor proteico do leite, determinado pelo método de Kjeldahl⁶ - no leite em alguns laticínios da China, em 2008 culminou com a morte de 6 bebês e a intoxicação de 300 mil indivíduos⁷.

Nesses casos, além de implicações éticas e sociais, a questão da qualidade do leite também tange áreas econômicas e técnico-científicas. O Brasil é um país com ampla produção de leite e, contrastando-se a isso, encontra-se hoje em posição delicada frente a outros países no que diz respeito à exportação desse produto, visto que existem barreiras não tarifárias com relação à qualidade de nosso leite. De fato, a qualidade média do leite brasileiro é considerada baixa⁸, o que representa um grande desafio nacional a ser superado. Esse cenário indica a necessidade de aperfeiçoamento de ferramentas para se avaliar e/ou monitorar a qualidade do leite, atinente às necessidades sociais, éticas e econômicas.

1.2 Qualidade e segurança do leite

Como um importante subconjunto dos atributos de qualidade dos alimentos, os parâmetros de segurança impactam diretamente na saúde do consumidor. Um alimento seguro é aquele que não oferece perigo à saúde e integridade do consumidor⁹. Agentes químicos, biológicos e/ou físicos podem representar perigos nos alimentos.

No contexto de perigos químicos, existem uma gama enorme de substâncias capazes de promover efeitos negativos na saúde humana, como micotoxinas, pesticidas, hormônios, contaminantes inorgânicos, entre outros. No presente trabalho, foram estudados Cd, Co, Cu, Cr e Pb, contaminantes inorgânicos naturalmente presentes em rochas, solos e nos mais diversos materiais¹⁰. Estes contaminantes estão envolvidos em processos geológicos naturais do planeta¹¹ e em diversos processos industriais modernos^{12,13}. Logo, são diversas as formas possíveis de contaminação de águas, plantas e, conseqüentemente dos animais^{14,15} e do homem por espécies desses elementos¹⁶.

Como fontes mais específicas desses contaminantes, os fertilizantes, pesticidas, drogas veterinárias e águas de irrigação merecem destaque, pois podem atuar como formas importantes de contaminação do solo, de plantas e animais, levando a contaminação potencial de seus produtos e do próprio homem¹⁷. Nesse contexto, o leite, enquanto produto de origem animal, pode ser então um agente de transferência de contaminação - oriunda de processos produtivos e insumos agrícolas envolvidos na sua obtenção - para o homem.

Portanto, para se maximizar o controle da segurança dos alimentos, em particular do leite, deve-se desenvolver métodos de determinação de contaminantes químicos cada vez mais eficientes, robustos, e que atendam a padrões de legislações (nacionais e internacionais) bem como os de políticas de controle, como o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC).

O PNCRC foi instituído pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) através da Instrução Normativa 42/1999¹⁸, publicada no Diário Oficial da União em 22 de dezembro de 1999. Desde então, vem a cada ano ampliando o escopo de resíduos e contaminantes químicos monitorados em diversas matrizes. Especificamente para a matriz leite, os contaminantes inorgânicos ainda não são contemplados pelo programa, o que reforça a contribuição deste trabalho de pesquisa em fornecer métodos analíticos adequados a subsidiar futuros protocolos oficiais de monitoramento de resíduos e contaminantes inorgânicos em alimentos. A única legislação nacional a delegar sobre contaminantes inorgânicos é a Portaria 685/1998, da ANVISA, onde é definido, apenas para chumbo, o limite de $0,05 \text{ mg.Kg}^{-1}$ em leite fluido pronto para o consumo.

Concomitantemente, o ritmo acelerado de desenvolvimento da ciência impõe a necessidade de repensar conceitos, pois limites outrora determinados como seguros para alguns resíduos e contaminantes químicos podem não mais + serem de fato seguros após a geração de novas evidências¹⁹. Por isso, este trabalho busca desenvolver um método analítico mais sensível do que as alternativas já disponíveis para a análise de leite, levando-se em conta critérios de aplicação - custo e capacidade analítica - necessários para ensaios de rotina em programas regulatórios oficiais.

Além disso, considerou-se importante estabelecer como analitos os elementos: Cd, Co, Cr, Cu e Pb. A decisão por estes analitos foi tomada levando-se em consideração uma série de fatores sobre tais elementos, como: possuírem caráter acumulativo, potencial de ascensão na cadeia alimentar²⁰ e são ligados a processos antrópicos atuais e em expansão^{12,13,21}.

Coletivamente, esses fatos indicam a importância de pesquisas em fronteira de conhecimento para estabelecimento de métodos otimizados para o controle de contaminantes químicos em alimentos.

Assim, espera-se que com a disponibilização de métodos analíticos para controle desses contaminantes químicos em leite possa-se não somente contribuir para a maximização de sua segurança e, conseqüentemente, para a melhoria da saúde pública, mas também para que sirva como valiosa referência de protocolos de trabalho analítico para outros alimentos.

1.3 “Metais pesados”

Segundo Appenroth²², parece existir um consenso na literatura de que a definição de metais pesados não é adequada, uma vez que é difícil identificar uma característica comum que consiga agrupar adequadamente todos os elementos que assim tem sido denominados na literatura.

Atinente a essa questão, esclarece-se que o termo metais pesados, quando empregado neste trabalho, não tem a pretensão de referir-se a um grupo bem definido de elementos com alguma característica em comum (densidade, toxicidade, etc.). Pretende-se, no entanto, apenas referir-se genericamente a contaminantes inorgânicos, como cádmio, chumbo, cromo, cobre, cobalto, entre outros elementos químicos.

1.3.1 “Metais pesados” no meio ambiente

Os metais pesados são elementos amplamente dispersos no meio ambiente^{23,24}, sejam oriundos de processos naturais e geológicos ou de processos antrópicos.

O chumbo, por exemplo, é considerado o metal pesado de maior ocorrência natural em solos²⁵, com concentrações variando entre 1 e 200 mg.Kg⁻¹. Os dois isótopos mais abundantes de chumbo - ²⁰⁶Pb e ²⁰⁸Pb - são produtos finais do decaimento radioativo natural dos elementos ²³⁸U e ²³²Th^{26,27}, encontrados naturalmente em elevadas concentrações em amostras de solo e de rochas de algumas regiões do nordeste brasileiro²⁸.

Aos processos naturais nos quais os metais pesados estão envolvidos, somam-se processos antrópicos em crescente expansão mesmo nos dias atuais. A contaminação do meio ambiente por metais pesados tem sido intensificada pelo avanço tecnológico e surgimento de diversos novos processos industriais, além do aumento da frota de veículos mundial²⁹ e da intensificação de atividades agrícolas de

grande escala, com utilização de fertilizantes e outros agroquímicos. É possível, por exemplo, encontrar compostos de chumbo em tubulações e em placas industriais, soldas, materiais de revestimento na indústria automotiva, tintas, esmaltes, vidros, materiais protetores contra radiação ionizante e em placas de baterias elétricas e acumuladores. Estima-se, inclusive, que a manufatura de baterias elétricas seja responsável por 70% do consumo mundial de chumbo^{30,31}.

Portanto, o aumento nas emissões urbanas, industriais e agrícolas tem contribuído para dispersar ainda mais esses elementos no meio ambiente, fazendo com que alguns desses metais – especialmente cádmio e chumbo – tornem-se quase que ubíquos, facilitando sua entrada na cadeia alimentar e aumentando as possibilidades do surgimento de efeitos negativos a seres humanos e animais²⁰.

1.3.2 “Metais pesados” no leite

Apesar de ser um alimento de grande importância nutricional, o leite pode conter uma grande variedade de contaminantes químicos e biológicos²⁴. Os metais pesados, que são os contaminantes foco deste estudo, estão dispersos no ambiente, podem ser absorvidos por plantas e, através destas, serem transferidos aos animais. Para os ruminantes, além da exposição através da vegetação, existe também a exposição devido a ingestão de camadas de solo³², que geralmente possuem as mais altas concentrações de metais pesados^{33,34}.

Uma vez contaminado pelo elemento, o animal pode excretar quantidades variáveis desse contaminante através do leite, o que constitui uma grande ameaça à saúde humana, considerando-se que, dentre todas as outras vias possíveis de contaminação, a mais importante delas é a ingestão, sendo responsável por 90% da assimilação dos metais pesados nos seres humanos³⁵.

Alguns estudos indicam a presença de metais pesados no leite^{20,23,25,35-38} e em seus derivados^{25,39,40} em quantidades muito variáveis (desde aproximadamente 2 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ a 1050 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$) sendo que nos derivados, são encontrados níveis mais elevados (2 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ a 1050 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de chumbo em queijo coalho) do que no leite (3 $\mu\text{g.L}^{-1}$ a 90 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de chumbo em leite). Acredita-se que durante o processo de coagulação do leite para a remoção do soro e produção dos queijos, haja um aumento na concentração dos metais devido a uma maior afinidade desses com as caseínas e com a gordura do leite⁴⁰.

Considerando-se as evidências existentes na literatura da presença de metais pesados em leite e derivados, aliadas à grande representatividade desses alimentos na dieta humana e aos severos efeitos negativos desses elementos no organismo, métodos de investigação e acesso às concentrações desses contaminantes em leite e derivados são assuntos de grande importância e tem atraído a atenção de diversos grupos de pesquisa pelo mundo.

1.4 Métodos para a determinação de contaminantes inorgânicos em leite

Uma revisão feita por Kira e Maihara³⁹ nos métodos da International Association of Official Analytical Chemists (AOAC) para determinação de elementos inorgânicos em alimentos mostrou que quase todos os métodos existentes empregam técnicas como espectroscopia de absorção molecular UV/Vis, voltametria de *stripping* anódico ou espectrometria de absorção atômica em chama e/ou forno de grafite combinados com digestão por via-seca ou por via-úmida das amostras.

Foram escassos os métodos que utilizavam a técnica de espectrometria de emissão atômica em plasma indutivamente acoplado (ICP-AES) em leite cru visando a determinação de contaminantes inorgânicos como Cd, Co, Cr, Cu e Pb, sendo que estes métodos utilizavam digestão das amostras por via-úmida empregando uma mistura de HNO₃ e HClO₄, que possui diversas dificuldades associadas, pois é necessário rigoroso controle do processo a fim de evitar que as amostras sequem completamente, para diminuir os riscos de explosões ou perdas de analitos⁴¹⁻⁴³.

De todas as técnicas supracitadas, a espectrometria de emissão atômica em plasma indutivamente acoplado (ICP-AES) merece destaque por ser a única entre elas com a característica da determinação multielementar. Ou seja, a utilização de ICP-AES possibilita, ao contrário das outras técnicas, a determinação simultânea (ou quase simultânea, no caso dos instrumentos sequenciais) de todos os elementos de interesse. Nos outros casos, para cada um dos elementos de interesse é necessária a realização de um novo procedimento de calibração do equipamento e de uma nova análise para todas as amostras, o que, por si só, torna todo o método inviável - ou no mínimo inconveniente - para aplicações em larga escala, necessárias em procedimentos regulatórios.

Com relação a métodos não oficiais, existem vários trabalhos descritos na literatura^{1,14,44-46}, porém a maioria destes destinam-se a determinação de macronutrientes e - a exemplo dos métodos oficiais AOAC - utilizam técnicas de digestão com diversos problemas associados e incompatíveis com as características buscadas neste trabalho, que são: simplicidade, pouco consumo de reagentes, grande frequência analítica e com potencial de aplicação em larga escala, para fins regulatórios.

Nesse contexto, torna-se evidente a importância e a necessidade do desenvolvimento de métodos voltados à determinação de micronutrientes/contaminantes inorgânicos em alimentos utilizando a técnica de ICP-AES aliada a um preparo de amostras diferenciado, visando agregar às opções de métodos atualmente existentes características como simplicidade, redução de custos, aumento de capacidade analítica, diminuição dos riscos de acidentes, explosões e perdas de analitos e potencial de aplicação em larga escala.

1.5 Preparo de amostras para determinação de contaminantes inorgânicos em leite

O preparo de amostras de leite para determinação de contaminantes inorgânicos é, por vezes, trabalhoso e apresenta uma série de complexidades, provenientes das características bastante singulares desta matriz. Diante disso, Silva⁴⁷ destaca que:

A análise de leite e produtos derivados de maneira geral é complicada pela necessidade de uma etapa trabalhosa e longa da mineralização. Assim, na calcinação da amostra inclui-se um tratamento inicial para carbonização em uma placa com aquecimento controlado e subsequente transferência para uma mufla sob temperaturas de 250 a 500°C por um período que varia de 15 a 30 horas ou até mais. Além desse tempo excessivo, a calcinação apresenta a desvantagem de que elementos voláteis podem ser perdidos. Por outro lado, a mineralização por via úmida é o procedimento mais usado na análise de leite e seus derivados, necessitando de um tempo entre 2 e 3 horas, enquanto que em um forno de micro-ondas o processo pode ser reduzido para 15 a 30 minutos, para a decomposição.

A introdução direta de amostras em ICP-AES ou em ICP-MS, na forma de emulsão, tem se tornado uma opção atrativa para a análise de micro e macro constituintes em leite. Este processo não requer uma manipulação exaustiva das amostras e não apresenta a maioria das contaminações indesejáveis impostas por

reagentes normalmente usados em digestões úmidas e processos de calcinação, perdas por retenções quando o elemento de interesse reage com o frasco usado na calcinação e o tempo consumido nestas mineralizações.

Neste contexto, a literatura disponível mostra que não há ainda um consenso com relação ao método mais adequado e/ou eficiente para o tratamento de amostras de leite. O que normalmente ocorre é que alguns métodos de preparo se apresentam adequados para determinação de certos elementos, mas são inadequados para outros.

Stürup e Büchert⁴⁴ estudaram um método de tratamento de amostra de leite em meio alcalino - empregando uma mistura de hidróxido de potássio e hidróxido de tetrametilamônio. Porém, apenas obtiveram êxito na determinação de Al, As, Cd, Cr, Ni, Pb e Se devido à insolubilidade de outros elementos inorgânicos em meio alcalino, ou à menor susceptibilidade a interferências poliatômicas dessas espécies, no caso de análises por espectrometria de massas com fonte de plasma (ICP-MS).

Li-QiangQinet *al.*³⁶ utilizaram um método de digestão assistida por microondas, em que era adicionado ácido nítrico e peróxido de hidrogênio à amostra de leite, seguida de predigestão noturna e o subsequente tratamento com microondas. Com este procedimento, os autores conseguiram determinar nove microconstituintes do leite em material de referência certificado (MRC) - Zn, Fe, Mn, Cu, Mo, Cr, Se, Sr e Rb - com resultados compatíveis com os valores certificados.

Nóbrega *et al.*⁴⁵ utilizaram, com sucesso, uma mistura de aminas terciárias - reagente comercial denominado CFA-C[®] - para o tratamento de amostras de leite visando a determinação de Ca, K, Mg, Na, P e Zn por ICP-AES e Al, Ba, Cu, I, Mn, Mo, Pb, Rb, Se, Sr, e Zn por ICP-MS. Com exceção do selênio, os valores determinados pelo método para todos os elementos se mostraram concordantes,

em um nível de confiança de 95%, com valores certificados pelo NIST.

Santos *et al.*⁴⁸ desenvolveram soluções de aminas que apresentaram desempenho semelhante ao reagente comercial CFA-C[®] para a determinação de Ca, K, Mg, Na, P, Ba, Cu, Fe, Mn e Zn em leite. Esse trabalho viabiliza para rotinas o uso da preparação de amostras em meio alcalino, visto que as soluções podem ser preparadas no laboratório e, por isso, foi utilizado como base para o estudo desenvolvido neste projeto. Os resultados obtidos com o método para todos os analitos se mostraram concordantes, em um nível de 95% de confiança, com os valores certificados para o material analisado (NIST SRM 8435).

Nesses métodos em que se utiliza o reagente comercial CFA-C[®], ou as soluções propostas por Santos *et al.*⁴⁸, a amostra é geralmente diluída em uma solução de um desses reagentes e introduzida diretamente no ICP-AES. Isso é extremamente atrativo, pois há um menor risco de contaminação da amostra - devido à menor manipulação da mesma - e maior praticidade e velocidade de tratamento das amostras, o que facilita as aplicações em análises de rotina.

Apesar das interessantes características desse tratamento de amostras, não foram encontrados registros na literatura abordando a utilização deste tratamento para determinação de contaminantes inorgânicos como Cd, Co e Cr - espécies de interesse neste projeto - utilizando a técnica de ICP-AES.

Portanto, para o tratamento das amostras, neste trabalho, foi escolhida a utilização da diluição do leite cru em uma mistura de aminas, conforme proposto por Santos *et al.*⁴⁸.

É importante ressaltar que a escolha da utilização da mistura de aminas proposta por Santos *et al.* ao invés do reagente comercial CFA-C deve-se ao fato de que este último é importado, possui preço elevado e maior dificuldade de obtenção em mercado nacional. Portanto, a utilização da mistura de aminas agrega ao método uma

importante redução de custos concomitantemente com o aumento da facilidade de obtenção do reagente. Esse conjunto de vantagens ajusta-se plenamente com a argumentação defendida até então, de priorizar metodologias mais simples, portáteis a aplicação em larga escala e com custo reduzido ao máximo possível.

Nessa abordagem, a amostra é diluída em meio de amins e posteriormente introduzida no equipamento de ICP-AES em condições otimizadas e empregando um sistema de nebulização apropriado. Consequentemente, a adequação deste procedimento como um todo foi avaliada ao longo deste projeto, visando a determinação dos analitos em amostras de leite cru.

1.6 Contexto de execução do projeto

O presente trabalho emana de um contexto de execução de estudos especiais de interesse nacional em qualidade e segurança de alimentos, em alinhamento às necessidades estratégicas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, entre outros órgãos do Poder Público. Dessa forma, contribuiu para fortalecer a parceria entre o Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora e o Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Gado de Leite.

O Laboratório de Qualidade do Leite (LQL) da Embrapa Gado de Leite, onde todos os ensaios foram conduzidos, é membro da Rede Brasileira de Qualidade do Leite (RBQL), analisando mais de 30 mil amostras/mês de leite bovino cru, principalmente provenientes de estabelecimentos submetidos ao Serviço de Inspeção Federal-SIF. Rotineiramente, o LQL executa ensaios microbiológicos e físico-químicos com a finalidade de subsidiar o Programa Nacional para Melhoria da Qualidade do Leite (PNQL), bem como a fiscalização por parte do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, mas vem atendendo crescentemente a necessidades analíticas avançadas no âmbito da Embrapa Gado de Leite.

Dessa forma, o presente estudo vem a fortalecer decisivamente as parcerias institucionais de elevado impacto, indicando um cenário futuro promissor para sua evolução continuada, notadamente a formação de capital humano de elevada competência.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Desenvolver um método para a determinação de contaminantes inorgânicos em leite bovino cru que tenha alta frequência analítica, potencial de aplicação em procedimentos de rotina em larga escala e sensibilidade adequada aos níveis determinados em legislações; características estas indispensáveis em métodos utilizados em programas de monitoramento e controle de segurança de alimentos.

2.2 Objetivos específicos

- Estabelecer um procedimento para o preparo de amostras de leite, com diluição em solução contendo etanolamina e ácido cítrico visando a determinação de Cd, Co, Cr, Cu e Pb nesta matriz utilizando a técnica de ICP-AES
- Avaliar a influência de variáveis do preparo de amostra na sensibilidade do método para cada um dos analitos.
- Avaliar a influência de variáveis instrumentais na robustez do plasma e otimizar tais variáveis de maneira a obter um plasma robusto, capaz de anular ou minimizar possíveis efeitos de matriz.
- Selecionar, para cada analito, linhas de emissão mais adequadas em termos de interferências, visando refinar a sensibilidade e desempenho do método analítico.
- Avaliar critérios de desempenho do método - tais como exatidão, precisão, limites de detecção e de quantificação - a fim de garantir a funcionalidade e adequação do método.

3 Parte experimental

3.1 Materiais e reagentes

Todas as soluções utilizadas foram preparadas com água ultrapura (Milli-Q) com resistividade igual a 18,2 M Ω .cm e menos que 2 μ g.L⁻¹ de carbono orgânico total (TOC). As vidrarias utilizadas para as determinações dos contaminantes inorgânicos foram todas descontaminadas em banho de HNO₃ 10% (v/v) por, no mínimo, 24 horas.

Os seguintes padrões monoelementares e rastreáveis ao NIST foram utilizados: cromo, cádmio, cobalto, chumbo, cobre e ítrio (todos FlukaAnalytical- Buchs, Switzerland); todos à concentração de 1000 mg.L⁻¹ e em meio ácido.

Para os procedimentos de tratamento das amostras utilizou-se ácido nítrico (Sigma-Aldrich - Seelze, Germany), ácido cítrico (Sigma-Aldrich - Vienna, Austria) e Etanolamina (Sigma-Aldrich - Seelze, Germany).

Os procedimentos de preparo das amostras foram realizados em tubos cônicos de 15 mL para centrifugação (Corning Inc. - Corning, USA) feitos em PTFE.

3.2 Instrumentação

Para determinação de contaminantes inorgânicos, as medidas foram realizadas em um espectrômetro de emissão óptica em plasma indutivamente acoplado (ICP-AES) modelo Optima™ 7000DV (Perkin Elmer - Waltham, MA, USA) utilizando-se a configuração axial da tocha e argônio 99,999% de pureza. O espectrômetro foi configurado com um nebulizador GemCone® (Perkin Elmer - Waltham, MA, USA) - adequado para amostras com alta concentração de sólidos dissolvidos - e com uma câmara de nebulização do tipo ciclônica. Para fins de ilustração, as Figuras 1 e 2 mostram uma imagem do sistema de nebulização utilizado.



Figura 1. Imagem do nebulizador utilizado no equipamento de ICP-AES



Figura 2. Imagem da câmara de nebulização utilizada no equipamento de ICP-AES

3.3 Metodologia analítica

3.3.1 Preparo de amostra

Para o preparo de amostras adotou-se um procedimento baseado na solubilização alcalina de uma alíquota de leite cru em uma mistura de etanolamina e ácido cítrico, a fim de formar uma emulsão estável e que pudesse ser introduzida diretamente no equipamento de ICP-AES. Para esse tratamento, preparou-se uma solução estoque contendo etanolamina e ácido cítrico e a partir deste estoque, preparou-se uma solução em pH 8,0, conforme descrito no diagrama a seguir:

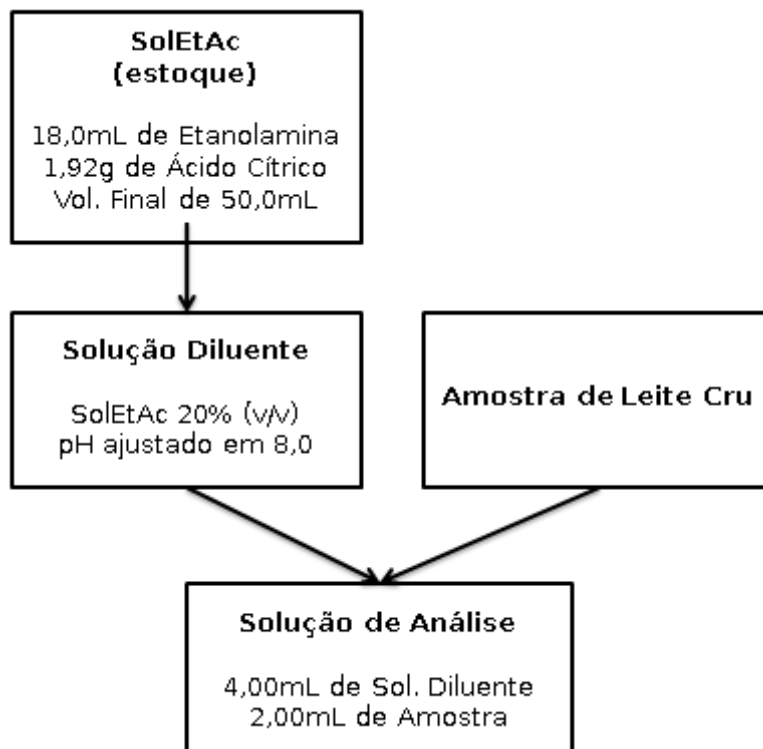


Figura 3. Diagrama do preparo de amostra para determinação de contaminantes inorgânicos.

No diagrama acima, a concentração da solução diluente, seu pH e a proporção de diluição da amostra correspondem a valores encontrados como ótimos em estudo multivariado realizado neste trabalho. Vale ressaltar que se utilizou calibração externa com sobreposição de matriz, em que amostras brancas (isentas dos contaminantes inorgânicos monitorados) de leite eram fortificadas e - após passar pelo tratamento descrito na Figura 3 (acima) - tinham seu sinal analítico mensurado e tomado como padrão.

3.3.2 Otimização das condições analíticas e validação do método

Para a otimização das condições analíticas - parâmetros instrumentais e variáveis do preparo de amostra - foram conduzidos estudos multivariados do tipo Box-Behnken, que permitem a avaliação dos efeitos das variáveis estudadas e também de suas interações.

O método foi avaliado por meio da investigação de sua robustez, linearidade, limites de detecção e quantificação, exatidão e precisão. A robustez, por ser definida como a capacidade do método de suportar pequenas variações das condições analíticas, foi avaliada na otimização das condições analíticas.

4 Resultados e discussão

O tratamento de amostras escolhido - baseado na diluição do leite em uma mistura de etanolamina e ácido cítrico e posterior introdução da emulsão obtida diretamente no equipamento - confere ao processo uma série de características favoráveis, como simplicidade, menor manipulação das amostras, maior frequência analítica e menor possibilidade de contaminação que os convencionais métodos de digestão. Porém, não se deve perder de vista que nesse tratamento a amostra não é mineralizada e, portanto, a natureza orgânica da matriz não pode ser desprezada.

Sendo assim, para que a determinação dos analitos na matriz fosse acurada, sensível e precisa, foi necessária a realização de uma série de estudos visando identificar variáveis relevantes - tanto instrumentais como do procedimento de preparo de amostra - e estabelecer valores otimizados para as mesmas.

Cabe destacar aqui que todos os estudos conduzidos neste trabalho foram de natureza multivariada, a fim de que os efeitos de interação entre as variáveis não fossem negligenciados. Tal característica consiste em um diferencial deste trabalho, tendo em vista que os estudos disponíveis na literatura para problemas semelhantes são univariados; ou seja, embora levem a uma condição analítica satisfatória, tais condições podem não ser as melhores possíveis, impactando, por exemplo, em limites de detecção ou precisão inferiores aos que se poderia obter.

Nesse contexto, espera-se que os estudos realizados neste trabalho representem um avanço na forma de se estabelecer métodos para análise de leite por ICP-AES. Até o presente momento, os poucos estudos relatados na literatura⁴⁹⁻⁵² para a técnica em questão e analitos de interesse, empregam apenas a estatística básica para o tratamento dos dados experimentais. Nesta dissertação, métodos estatístico-computacionais foram usados desde o planejamento de experimentos até a interpretação dos dados.

4.1 Otimização instrumental - Estudo de robustez do plasma

A fim de eliminar ou mitigar a interferência da matriz - em virtude de sua natureza orgânica - na determinação dos analitos, é importante estabelecer um conjunto de parâmetros instrumentais que proporcionem uma condição robusta para o plasma. Esta condição deve promover uma decomposição dos compostos orgânicos da matriz, minimizando seus efeitos de interferência. Isto se torna possível porque, no plasma robusto, o equilíbrio termodinâmico local é atingido, e os processos de transferência de energia são mais efetivos para a atomização, ionização e excitação da amostra³².

A robustez do plasma, enquanto parâmetro, pode ser mensurada pela razão entre as intensidades de emissão do magnésio iônico (280,270 nm) e do magnésio atômico (285,213 nm) (MgII/MgI), conforme recomendação da literatura⁵³, sendo que um valor maior ou igual a 10 para esta razão caracteriza um plasma robusto.

Conforme apontado por Peixoto *et al*⁴⁶., alguns artigos já avaliam a robustez do plasma a fim de determinar condições instrumentais otimizadas, no entanto, a maioria baseia-se em estudos univariados⁴⁹⁻⁵², negligenciando importantes efeitos de interação entre os fatores investigados. São escassos na literatura os trabalhos que realizam uma abordagem multivariada⁵⁴⁻⁵⁶ e, além disso, não se encontrou nenhum trabalho que avalie a robustez do plasma para equipamentos da série Optima™ 7000 - relativamente nova - ou para a mesma matriz deste trabalho.

Sendo assim, realizou-se um estudo multivariado, do tipo Box-Behnken, para avaliar a influência de três parâmetros instrumentais na robustez do plasma, medida pela razão Mg(II)/Mg(I) obtida enquanto uma amostra branca de leite, diluída em igual volume em

uma solução de etanolamina e ácido cítrico, foi introduzida no espectrômetro.

Entre as opções avaliadas para o delineamento do experimento multivariado, havia o Planejamento Composto Central (CC) e o Box-Behnken (BB). O Box-Behnken foi escolhido pelo fato de que ele - ao invés do Composto Central - evita experimentos sob condições extremas como, por exemplo, um experimento em que todas as variáveis instrumentais avaliadas estivessem em seu valor mínimo ou em seu valor máximo. Tais situações poderiam ser experimentalmente inviáveis, por promoverem um plasma incapaz de se sustentar durante a introdução da amostra com grande concentração de matéria orgânica não mineralizada ou um plasma com alto sinal de *background*, prejudicando sobremaneira a sensibilidade da técnica.

A Tabela 2 (a seguir) apresenta a estrutura do experimento fatorial realizado.

Tabela 2. Estrutura do planejamento fatorial Box-Behnken utilizado para a otimização das condições instrumentais do equipamento de ICP-AES.

Variável	(-1)	0	(+1)
(a) potência da radiofrequência(W)	1200	1300	1400
(b) vazão do gás de nebulização (L.min ⁻¹)	0,2	0,6	1
(c) vazão do gás auxiliar(L.min ⁻¹)	0,2	0,5	0,8

Ordem	a	b	c	Mg(II)/Mg(I)
1	-1	+1	0	4,04
2	-1	-1	0	6,41
3	0	+1	-1	6,94
4	0	-1	+1	4,89
5	+1	+1	0	5,71
6	0	+1	+1	3,85
7	0	0	0	11,2
8	0	0	0	11,5
9	0	0	0	11,5
10	0	-1	-1	5,02
11	-1	0	0	9,92
12	0	0	0	11,3
13	0	0	0	11,4
14	0	0	0	11,3
15	0	0	0	11,6
16	+1	0	-1	9,66
17	+1	-1	0	5,23
18	0	0	0	11,6
19	0	0	0	11,6
20	+1	0	+1	10,1
21	-1	0	-1	9,33

A partir dos resultados obtidos com o planejamento acima, realizou-se uma regressão linear para explicar a resposta - Mg(II)/Mg(I) - em função dos três parâmetros instrumentais avaliados, bem como seus termos de interação e de influência quadrática. Através da Tabela 3, abaixo, é possível observar que quase todos os termos são relevantes para explicar a resposta (robustez do plasma), inclusive os termos de interação.

Tabela 3. Coeficientes da regressão linear para os termos avaliados no planejamento experimental.

Legenda dos Termos			
(a) potência da radiofrequência			
(b) vazão do gás de nebulização			
(c) vazão do gás auxiliar			
Termo	Coeficiente	Erro Padrão	p-valor
Constante	11,4	0,184	2,31E-12
a	0,118	0,195	0,556261
b	-0,126	0,195	0,532247
c	-0,280	0,195	0,178708
a * b	0,711	0,276	0,025817
a * c	-0,052	0,276	0,855377
b * c	-0,742	0,276	0,021155
a ²	-0,764	0,256	0,012446
b ²	-5,33	0,256	3,49E-07
c ²	-0,934	0,256	0,003831

A análise dos p-valores na Tabela acima evidencia a necessidade de estudos de otimização multivariados, pois os termos de interação “a*b”, “a*c” e “b*c” são relevantes - a 99% de confiança - para explicar a resposta do planejamento e, conseqüentemente, a robustez do plasma.

A regressão obtida com os coeficientes da Tabela 2 (acima), apresentou-se altamente significativa ($F_{sig} = 128,35$ p-valor = 0,000) com um valor de R^2 ajustado de 0,9630, apesar de uma análise de variância indicar a possibilidade de falta de ajuste no modelo.

Sabe-se, no entanto, que a falta de ajuste não é um parâmetro global, podendo estar restrita apenas a uma região da superfície de resposta, o que provavelmente aconteceu neste estudo, pois o valor de R^2 ajustado indica que 96,30% de toda a variância está bem explicada pelo modelo traçado. Como o interesse da otimização não está sobre a superfície de resposta inteira, mas sim sobre a região de máxima resposta (máxima robustez), optou-se por utilizar sim a superfície de resposta e avaliar experimentalmente se o ponto da superfície escolhido apresenta robustez condizente com a predita pelo modelo. A seguir, pode-se observar as matrizes de contorno e as superfícies de resposta obtidas para as combinações dos fatores representados tridimensionalmente contra a variável resposta (robustez do plasma):

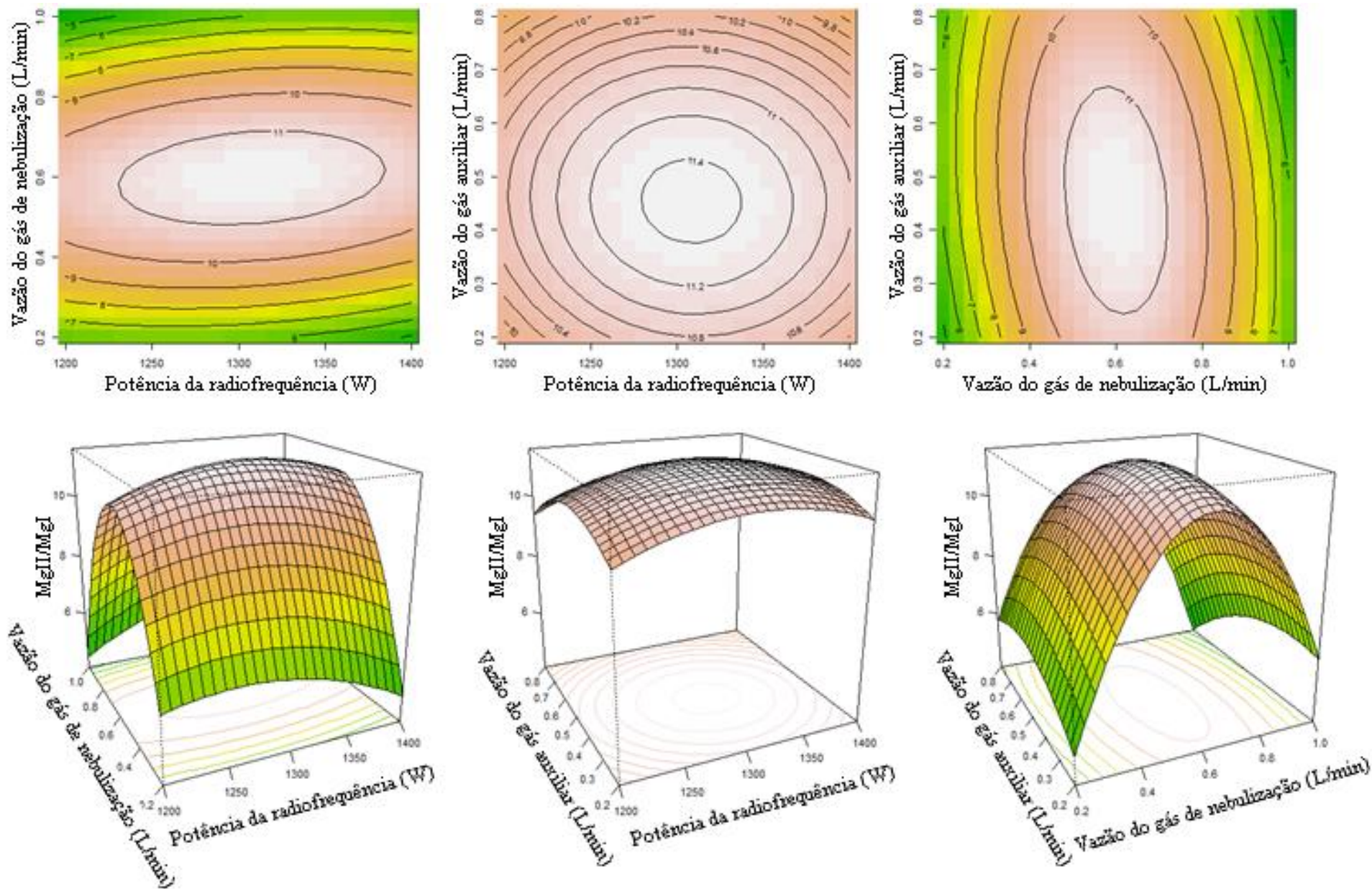


Figura 4. Representações gráficas das matrizes de contorno (linha superior) e das superfícies de resposta (linha inferior) com diferentes combinações de variáveis.

Vale ressaltar que devido ao fato de três variáveis instrumentais terem sido contempladas nesse estudo, além da variável resposta, em qualquer um dos gráficos uma das variáveis avaliadas deve ficar sem representação, por falta de dimensões suficientes. Os gráficos da figura acima são algumas combinações possíveis das variáveis, em que a variável não contemplada é sempre fixada em seu valor central.

Analisando os gráficos da Figura 4, nota-se que as combinações dos valores intermediários das variáveis, em geral, proporcionam os melhores valores de robustez do plasma. Tal observação é coerente com o esperado pela teoria, uma vez que sendo a potência da radiofrequência do plasma muito baixa, este não consegue transferir energia suficiente para a amostra; sendo muito alta, a intensidade de emissão do próprio plasma é bastante aumentada, prejudicando o sinal analítico e, conseqüentemente, a sensibilidade do método. Com relação às vazões dos gases auxiliar e de nebulização, vazões muito altas diminuem consideravelmente o tempo de residência da amostra no plasma, desfavorecendo a adequada transferência de energia deste para a amostra; por outro lado, vazões muito baixas implicam em um tempo de residência alto, o que possibilita um aumento de emissões de interferentes da matriz, prejudicando o sinal analítico.

Para utilização experimental uma das combinações deve ser escolhida. Nesse sentido, optou-se por escolher a que contemple graficamente a vazão do gás de nebulização e a potência da radiofrequência do plasma, omitindo e fixando a vazão do gás auxiliar em seu valor central.

O critério para a escolha partiu da avaliação dos p-valores obtidos para cada uma das variáveis experimentais, na Tabela 3. Nota-se nesta Tabela que a vazão do gás auxiliar apresenta o menor p-valor frente às outras duas variáveis, o que constitui indicativo que sua influência na robustez do plasma é mais sutil que a das outras duas variáveis. Diante disso, optou-se por utilizar a curva ilustrada

na Figura 5, em que a vazão do gás auxiliar - não representada graficamente - é fixada em seu valor central.

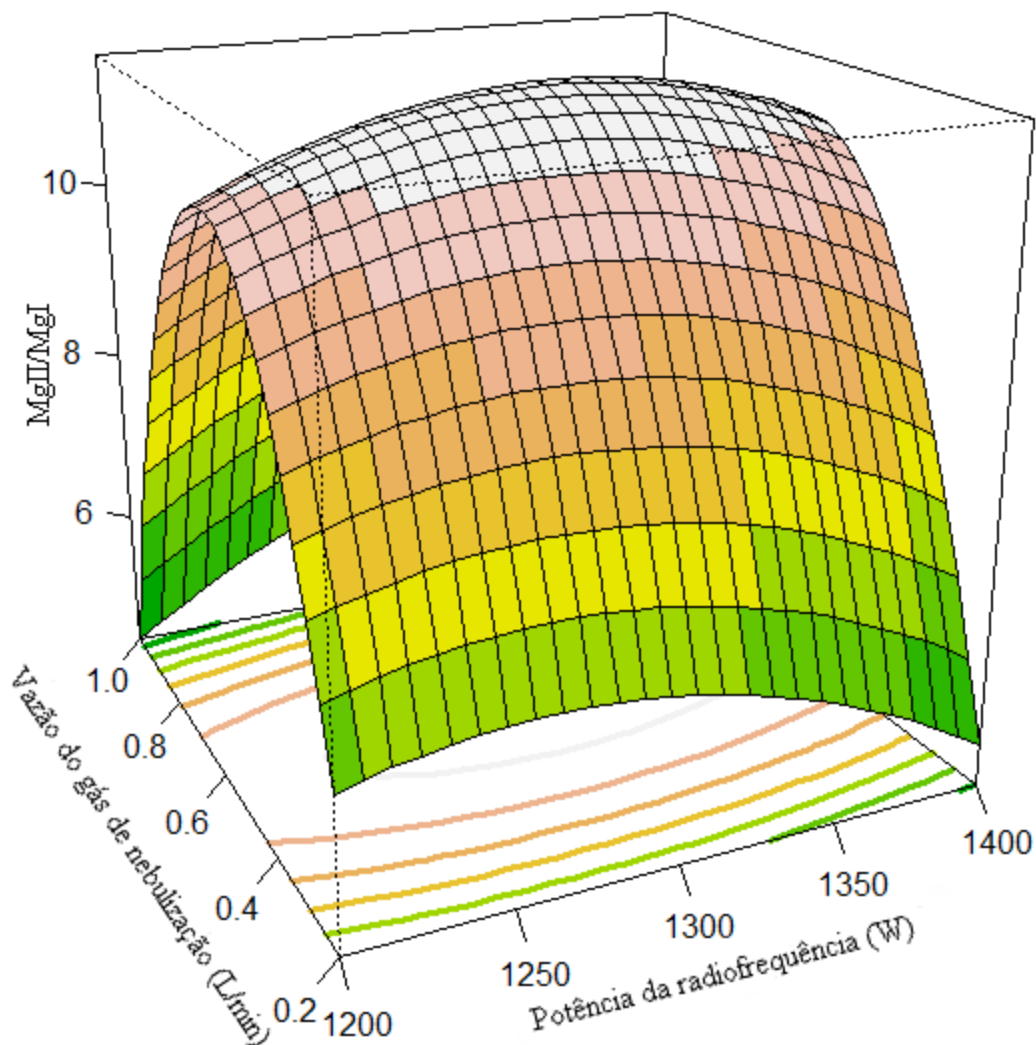


Figura 5. Superfície de resposta para a robustez do plasma obtida com a vazão do gás auxiliar fixada em $0,50 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$.

Na superfície de resposta da Figura 5, a região com maior valor para a razão MgII/MgI corresponde a condição de máxima robustez do plasma, sendo, portanto, a região de interesse para o método analítico proposto. Tal ponto é o ponto estacionário da curva e foi calculado pela seguinte expressão:

$$\partial \hat{y} / \partial x_1 = \partial \hat{y} / \partial x_2 = \partial \hat{y} / \partial x_3 = 0$$

Equação 1. Cálculo do ponto estacionário da superfície de resposta

A Tabela 4 (abaixo), contém os valores obtidos através da Equação 1:

Tabela 4. Valores dos parâmetros instrumentais escolhidos com base nos valores de \hat{y} obtidos na Equação 1.

Parâmetro	Valor escolhido
potência da radiofrequência	1300 W
vazão do gás de nebulização	0,60 L.min ⁻¹
vazão do gás auxiliar	0,50 L.min ⁻¹

Para avaliar o ajuste adequado do modelo na região de interesse - o ponto de máximo da superfície - mediu-se experimentalmente a razão Mg(II)/Mg(I) utilizando as condições da Tabela acima. O valor teórico apontado pelo modelo foi de 11,44, enquanto que o valor obtido em uma medida real foi de 11,27. O modelo apresentou um erro relativo de apenas 1,51% do valor experimental, o que evidencia o seu ajuste adequado para essa região da curva e que os valores escolhidos para cada um dos parâmetros levam a uma resposta ótima, em termos de robustez do plasma.

4.2 Estudo de variáveis do preparo de amostras

Uma vez que a condição de robustez do plasma - condição primordial para a execução de toda a análise - tenha sido estabelecida, foi possível delinear um estudo para avaliar a influência de variáveis do preparo de amostra na sensibilidade do método para os analitos.

Nesse sentido, foi realizado um estudo multivariado - fatorial fracionário do tipo Box-Behnken - de quatro parâmetros principais. Avaliou-se cinco respostas em paralelo, sendo estas as razões sinal-fundo (SBR) para cada um dos cinco elementos de interesse.

A Tabela 5, a seguir, apresenta a estrutura do experimento fatorial realizado.

Tabela 5. Estrutura do planejamento fatorial utilizado para estabelecer as condições ótimas do preparo de amostra. (*) SBR razão sinal fundo (do Inglês "Signal to background ratio") Nota: para Cd, Co, Cr, Cu e Pb utilizou-se, respectivamente, as seguintes linhas de emissão (nm): 228,802; 228,616; 267,716; 327,393 e 220,353

Variável	(-1)	0	(+1)
(a) concentração da solução diluente (% de SolEtAc)	20	30	40
(b) temperatura da solução de análise (°C)	25	45	65
(c) pH da solução de análise	8	9	10
(d) tempo de <i>delay</i> do espectrômetro (s)	20	40	60

Ordem	a	b	c	d	SBR*	SBR*	SBR*	SBR*	SBR*
					Cd	Co	Cr	Cu	Pb
1	-1	-1	0	0	0,53	2,15	7,26	1,10	1,01
2	+1	-1	0	0	0,40	1,59	3,36	1,05	1,37
3	-1	+1	0	0	0,01	2,23	8,27	1,45	1,45
4	+1	+1	0	0	0,48	2,08	4,28	2,23	0,96
5	0	0	-1	-1	0,56	2,16	5,35	1,42	0,83
6	0	0	+1	-1	0,41	2,18	6,05	1,59	1,02
7	0	0	-1	+1	0,57	2,11	6,84	1,63	1,13

8	0	0	+1	+1	0,43	2,16	5,63	1,84	0,95
9	0	0	0	0	0,07	2,16	3,46	0,70	1,21
10	0	0	0	0	0,19	2,18	3,28	0,77	1,17
11	0	0	0	0	0,24	2,19	4,63	1,24	1,08
12	-1	0	0	-1	0,76	2,50	3,69	1,01	1,46
13	+1	0	0	-1	0,49	1,95	3,04	1,13	1,12
14	-1	0	0	+1	0,67	2,43	4,66	1,12	1,44
15	+1	0	0	+1	0,44	1,92	3,41	1,05	1,09
16	0	-1	-1	0	1,14	2,04	2,67	0,80	1,40
17	0	+1	-1	0	0,50	2,27	5,86	1,70	0,79
18	0	-1	+1	0	0,44	2,13	3,52	1,10	1,40
19	0	+1	+1	0	0,30	2,53	6,12	2,21	1,00
20	0	0	0	0	0,10	2,35	5,55	1,86	1,06
21	0	0	0	0	0,09	2,49	5,65	1,78	1,03
22	0	0	0	0	0,11	3,32	3,86	3,41	0,96
23	-1	0	-1	0	0,61	2,37	6,83	1,29	0,90
24	+1	0	-1	0	0,37	3,70	3,37	5,66	1,41
25	-1	0	+1	0	0,06	2,23	3,14	0,34	1,09
26	+1	0	+1	0	0,25	1,91	3,52	1,65	0,93
27	0	-1	0	-1	0,37	2,77	5,87	3,12	1,26
28	0	+1	0	-1	0,13	2,13	4,55	1,33	1,03
29	0	-1	0	+1	0,60	2,43	7,77	3,79	1,10
30	0	+1	0	+1	0,08	2,53	6,11	1,89	1,01
31	0	0	0	0	0,78	2,40	2,43	0,92	1,98
32	0	0	0	0	0,30	2,35	2,60	1,01	2,39
33	0	0	0	0	0,14	2,18	3,45	1,09	1,21

O experimento acima permitiu avaliar a influência de cada uma das variáveis de preparo de amostra sob o SBR - e conseqüentemente, a sensibilidade - para cada um dos elementos investigados.

A Tabela 6 (a seguir) apresenta os coeficientes de regressão linear do modelo obtidos para cada variável investigada, bem como de suas interações e efeitos quadráticos.

Tabela 6. Coeficientes da regressão linear para os termos avaliados no planejamento experimental para otimização do preparo de amostra.

Legenda dos Termos					
(a) concentração da solução diluente					
(b) temperatura da solução de análise					
(c) pH da solução de análise					
(d) tempo de <i>delay</i> do espectrômetro					
Termo	Cd	Co	Cr	Cu	Pb
a	-1,07*	-0,063	0,538	-0,039	-0,018
b	0,395	0,055	-0,013	-0,108	-0,165*
c	-0,245	-0,126	-0,314	-0,006	-0,155*
d	0,489	-0,009	0,143	0,000	0,006
a * b	-0,023	0,103	0,208	-0,213	0,150
a * c	0,960	-0,413	-0,765	-0,168	0,108
a * d	-0,150	0,010	-0,048	0,003	0,010
b * c	-0,148	0,043	0,053	0,053	0,125
b * d	-0,085	0,185	-0,028	0,035	-0,070
c * d	-0,478	0,008	0,010	-0,092	0,002
a ²	-0,134	-0,089	-0,054	-0,024	0,080
b ²	1,22*	-0,112	0,282	-0,080	0,069
c ²	0,374	0,002	0,215	-0,197	0,151
d ²	0,883	-0,063	0,176	-0,012	0,135

* Coeficientes significantes a 95% de confiança

Para nenhum dos elementos investigados houve indícios de falta de ajuste no modelo, de modo que superfícies de resposta puderam ser obtidas sem necessidade de verificações adicionais de ajuste.

As Figuras a seguir apresentam, para cada elemento, as matrizes de contorno e as superfícies de respostas obtidas com a combinação das variáveis de preparo de amostras. Abaixo de cada gráfico encontra-se explicitado os valores fixados (“*Slice at*”) para as variáveis não representadas.

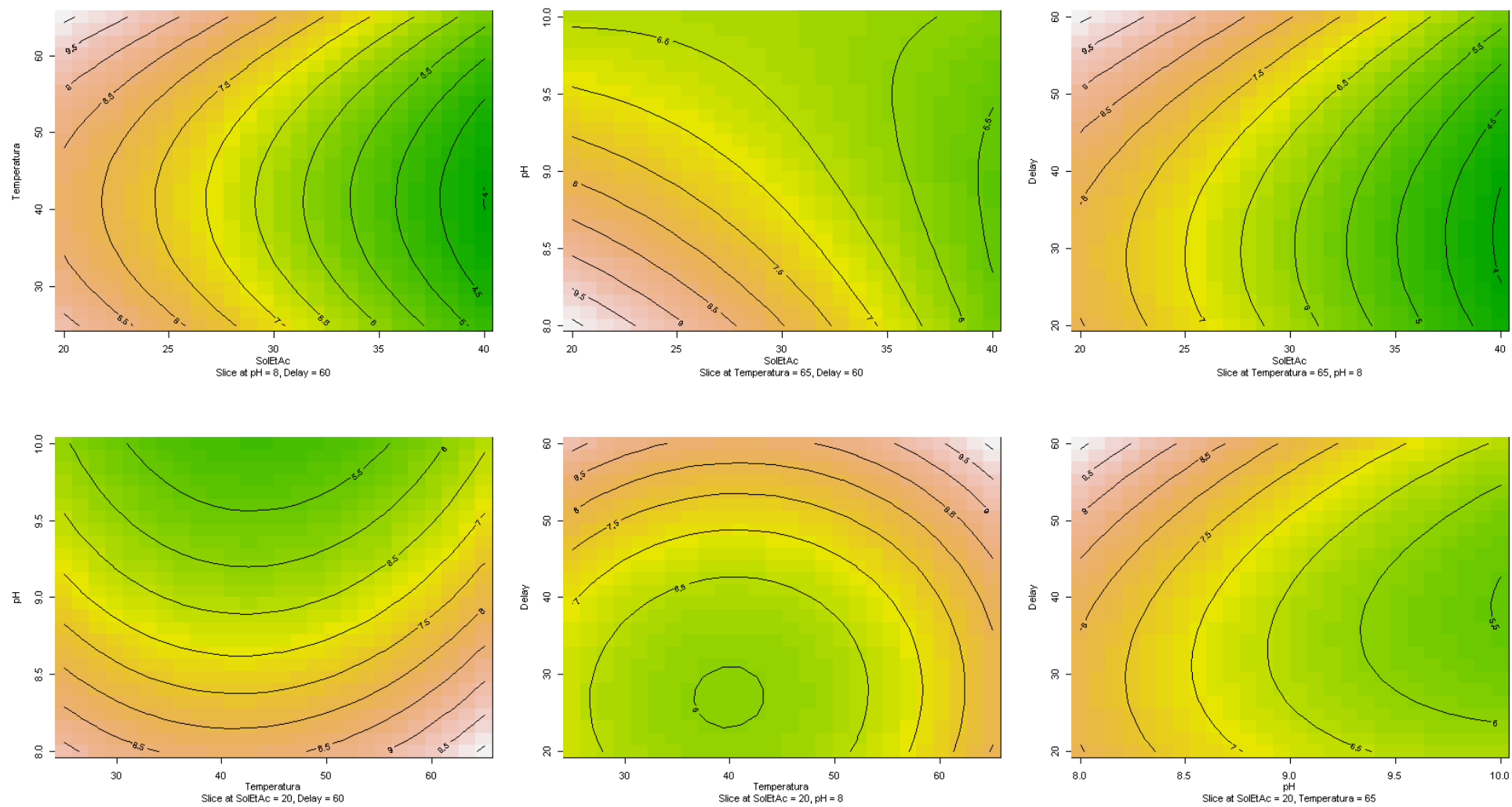
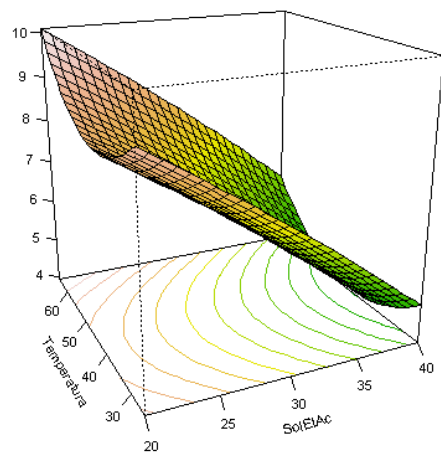
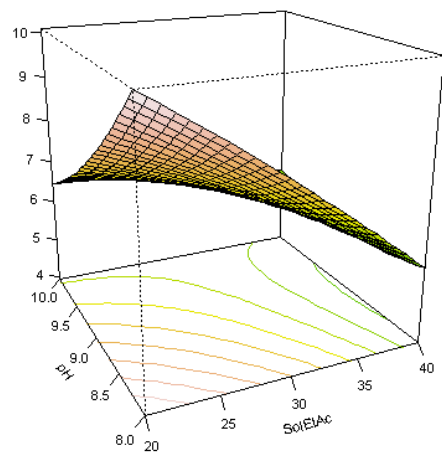


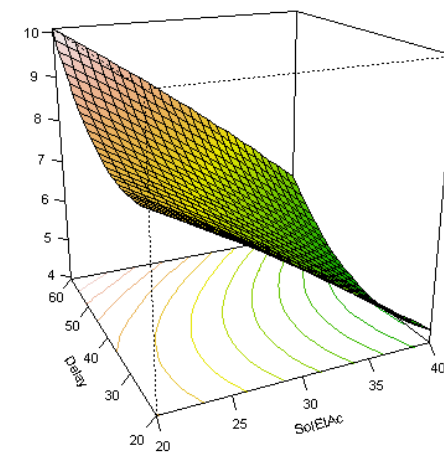
Figura 6. Matrizes de contorno obtidas para o cádmio com cortes otimizados para o maior valor de SBR.



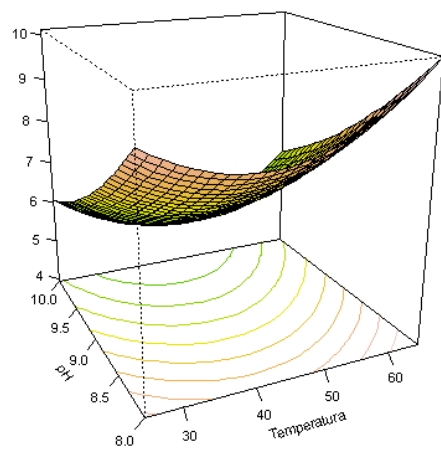
Slice at pH = 8, Delay = 60



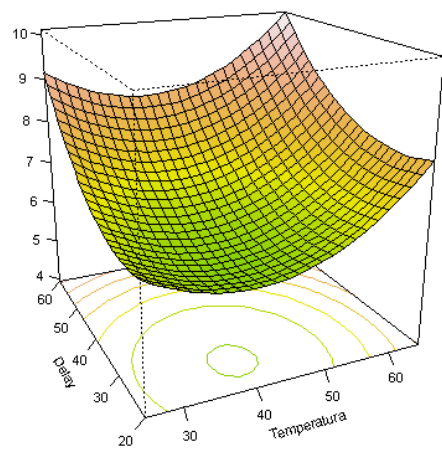
Slice at Temperatura = 65, Delay = 60



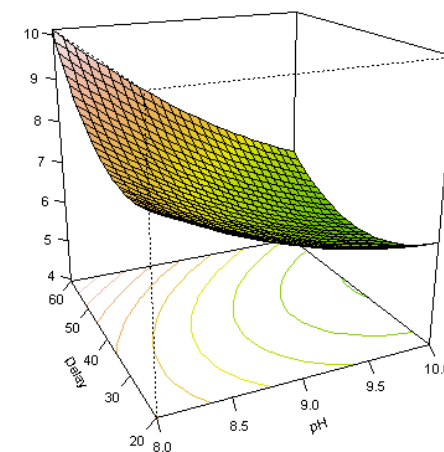
Slice at Temperatura = 65, pH = 8



Slice at SolEtAc = 20, Delay = 60



Slice at SolEtAc = 20, pH = 8



Slice at SolEtAc = 20, Temperatura = 65

Figura 7. Superfícies de resposta obtidas para o cádmio com cortes otimizados para o maior valor de SBR.

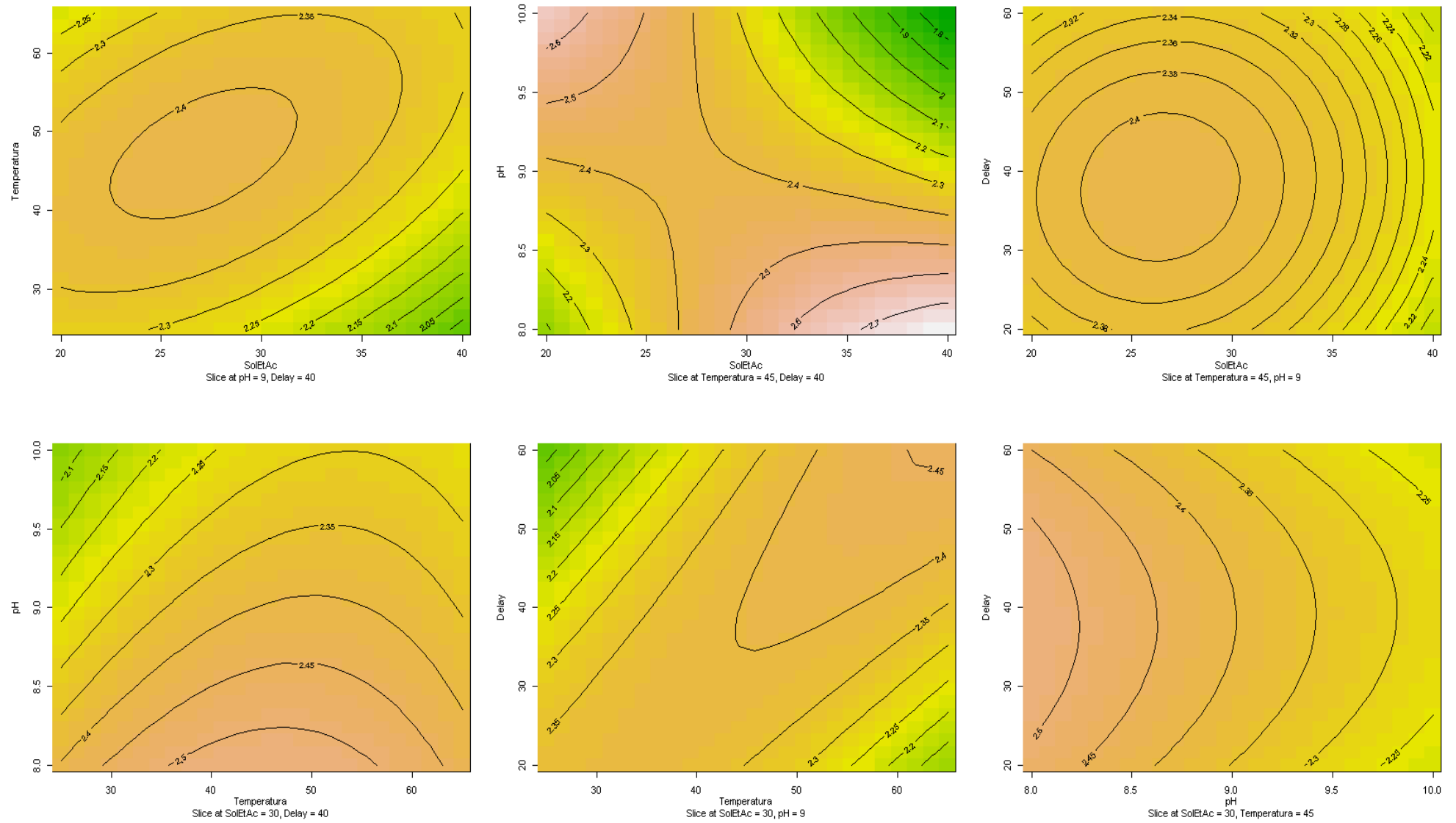
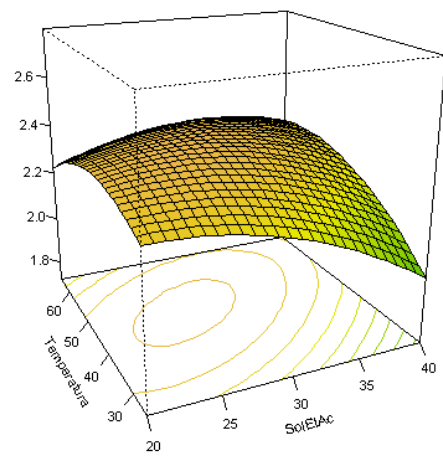
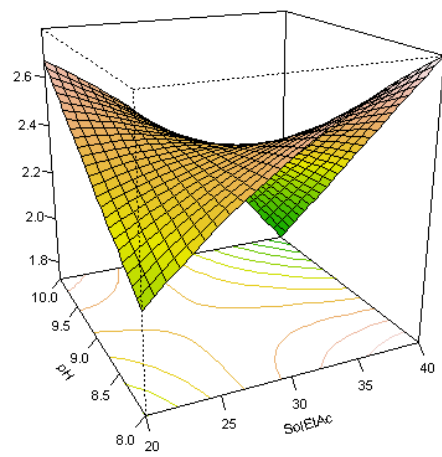


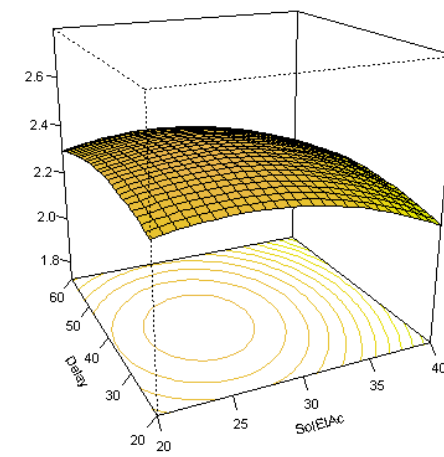
Figura 8. Matrizes de contorno obtidas para o cobalto com cortes otimizados para o maior valor de SBR.



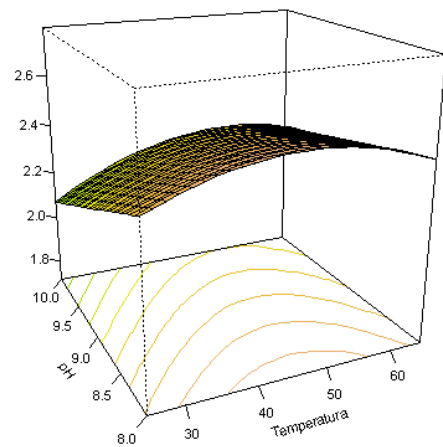
Slice at pH = 9, Delay = 40



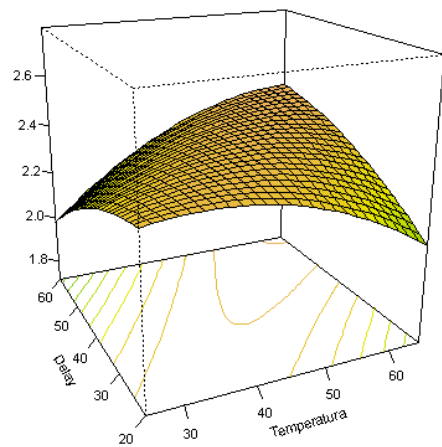
Slice at Temperatura = 45, Delay = 40



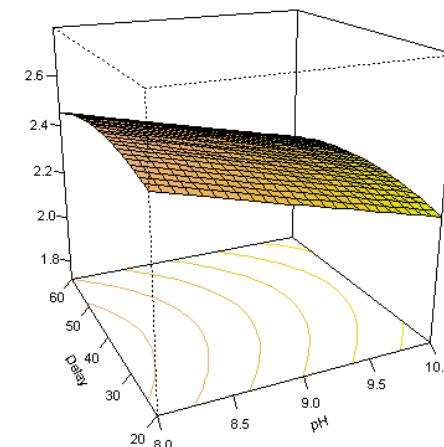
Slice at Temperatura = 45, pH = 9



Slice at SolEtAc = 30, Delay = 40



Slice at SolEtAc = 30, pH = 9



Slice at SolEtAc = 30, Temperatura = 45

Figura 9. Superfícies de resposta obtidas para o cobalto com cortes otimizados para o maior valor de SBR

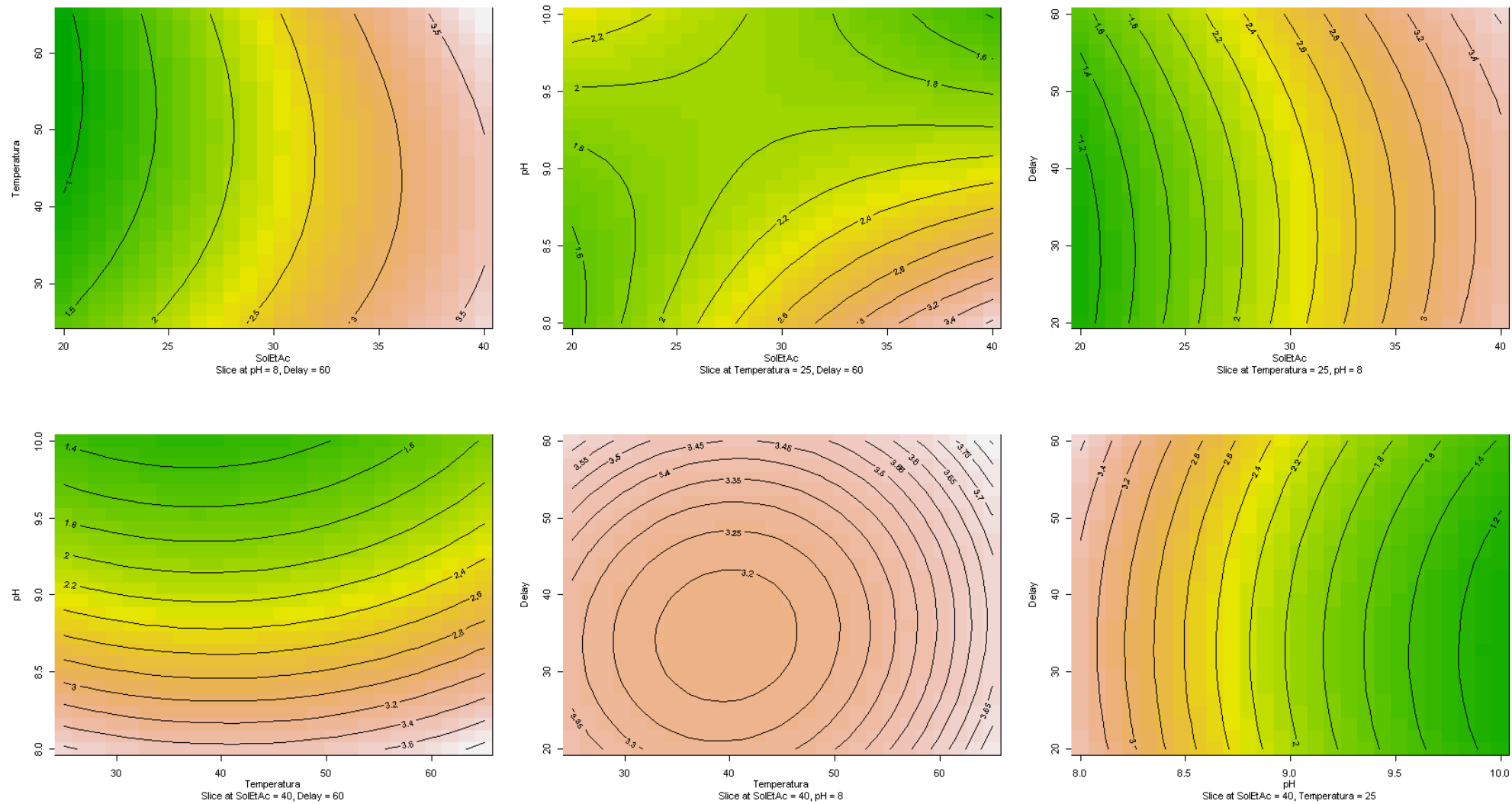
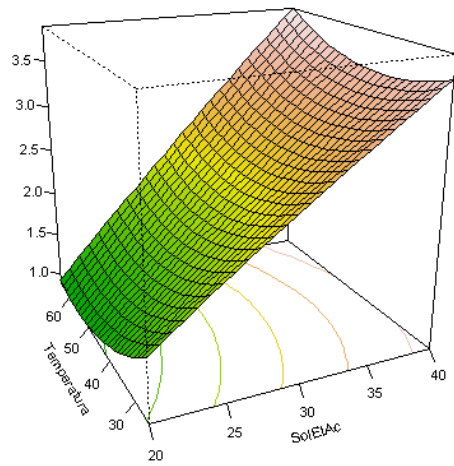
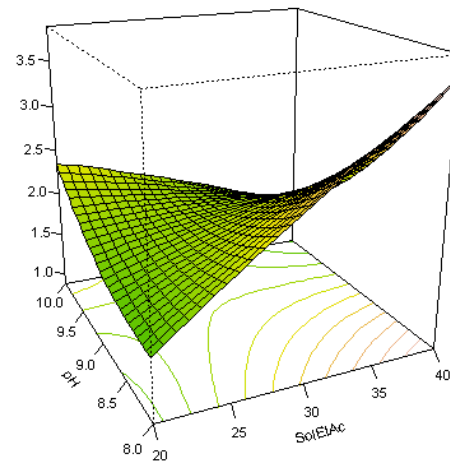


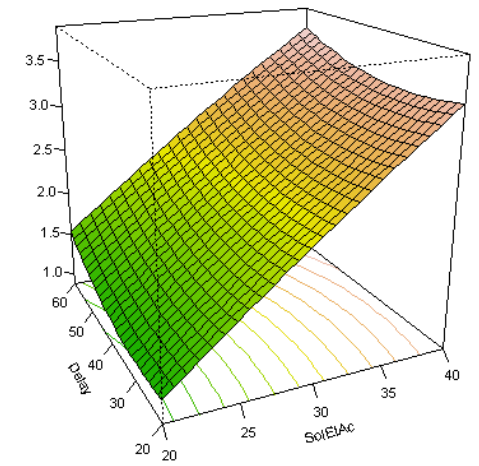
Figura 10. Matrizes de contorno obtidas para o cromo com cortes otimizados para o maior valor de SBR.



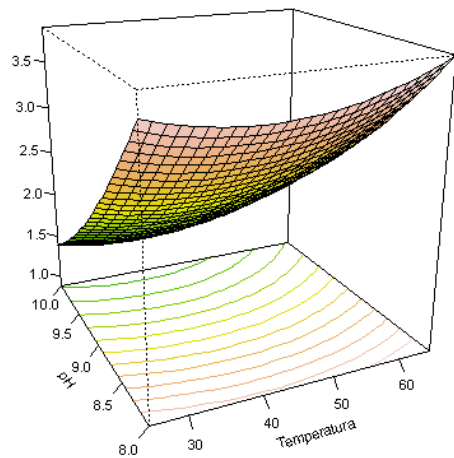
Slice at pH = 8, Delay = 60



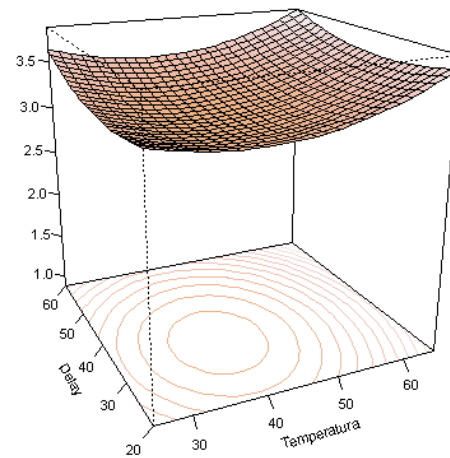
Slice at Temperatura = 25, Delay = 60



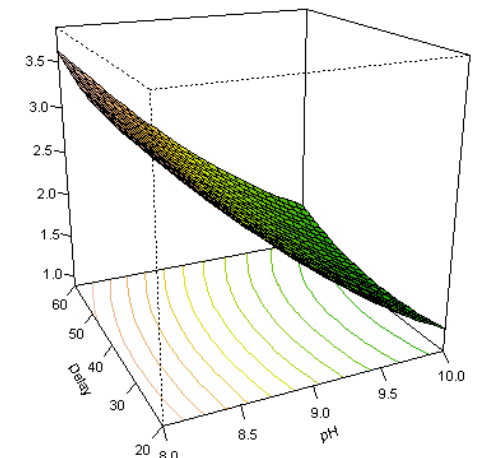
Slice at Temperatura = 25, pH = 8



Slice at SolEtAc = 40, Delay = 60



Slice at SolEtAc = 40, pH = 8



Slice at SolEtAc = 40, Temperatura = 25

Figura 11. Superfícies de resposta obtidas para o cromo com cortes otimizados para o maior valor de SBR

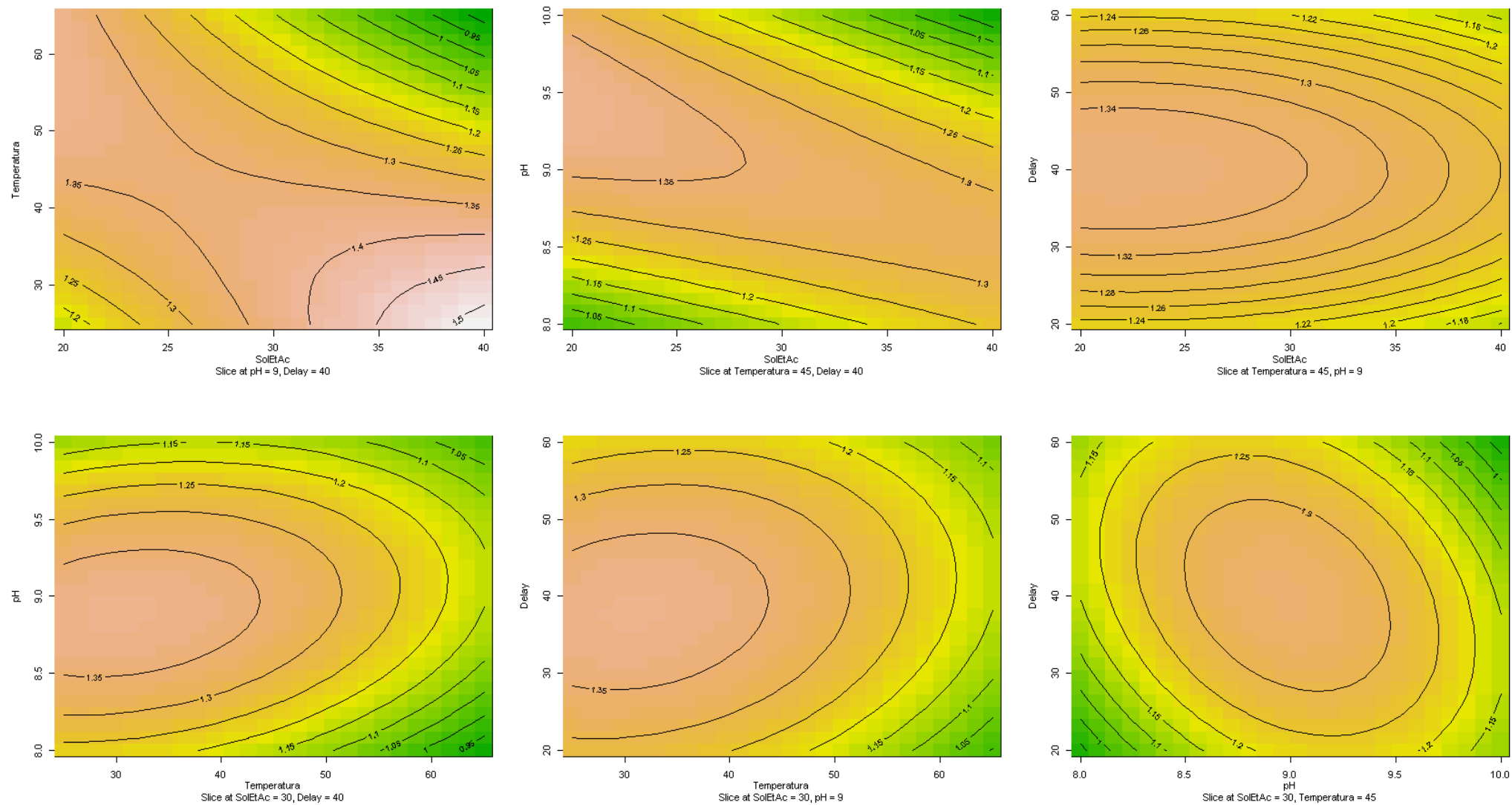
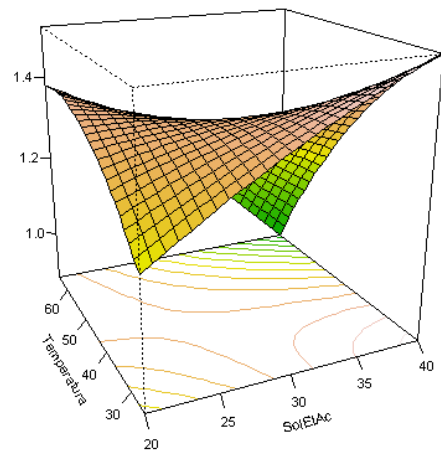
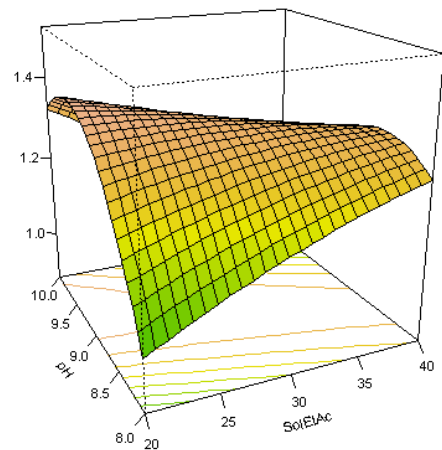


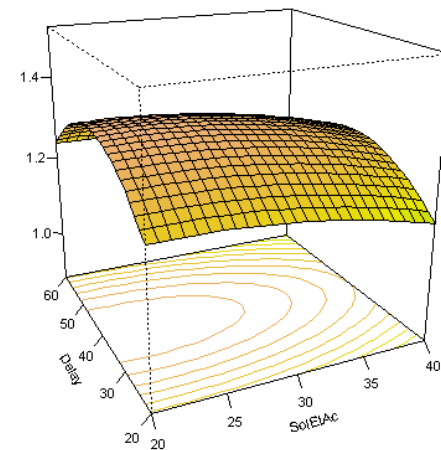
Figura 12. Matrizes de contorno obtidas para o cobre com cortes otimizados para o maior valor de SBR.



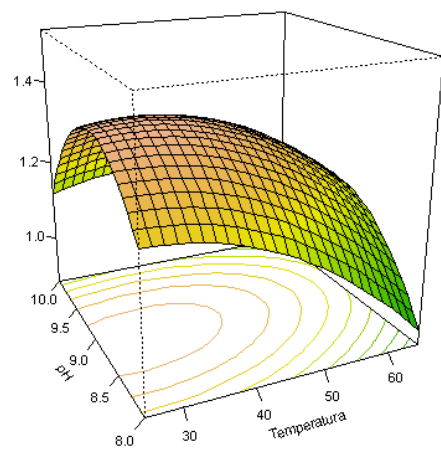
Slice at pH = 9, Delay = 40



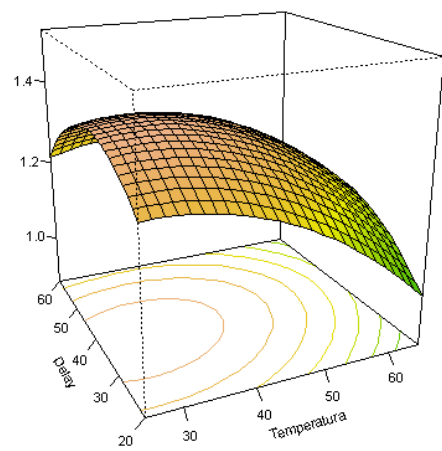
Slice at Temperatura = 45, Delay = 40



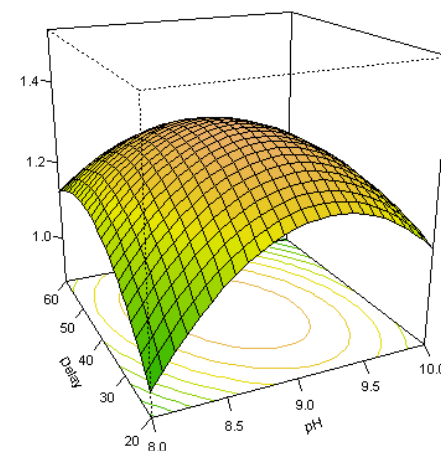
Slice at Temperatura = 45, pH = 9



Slice at SolEtAc = 30, Delay = 40



Slice at SolEtAc = 30, pH = 9



Slice at SolEtAc = 30, Temperatura = 45

Figura 13. Superfícies de resposta obtidas para o cobre com cortes otimizados para o maior valor de SBR

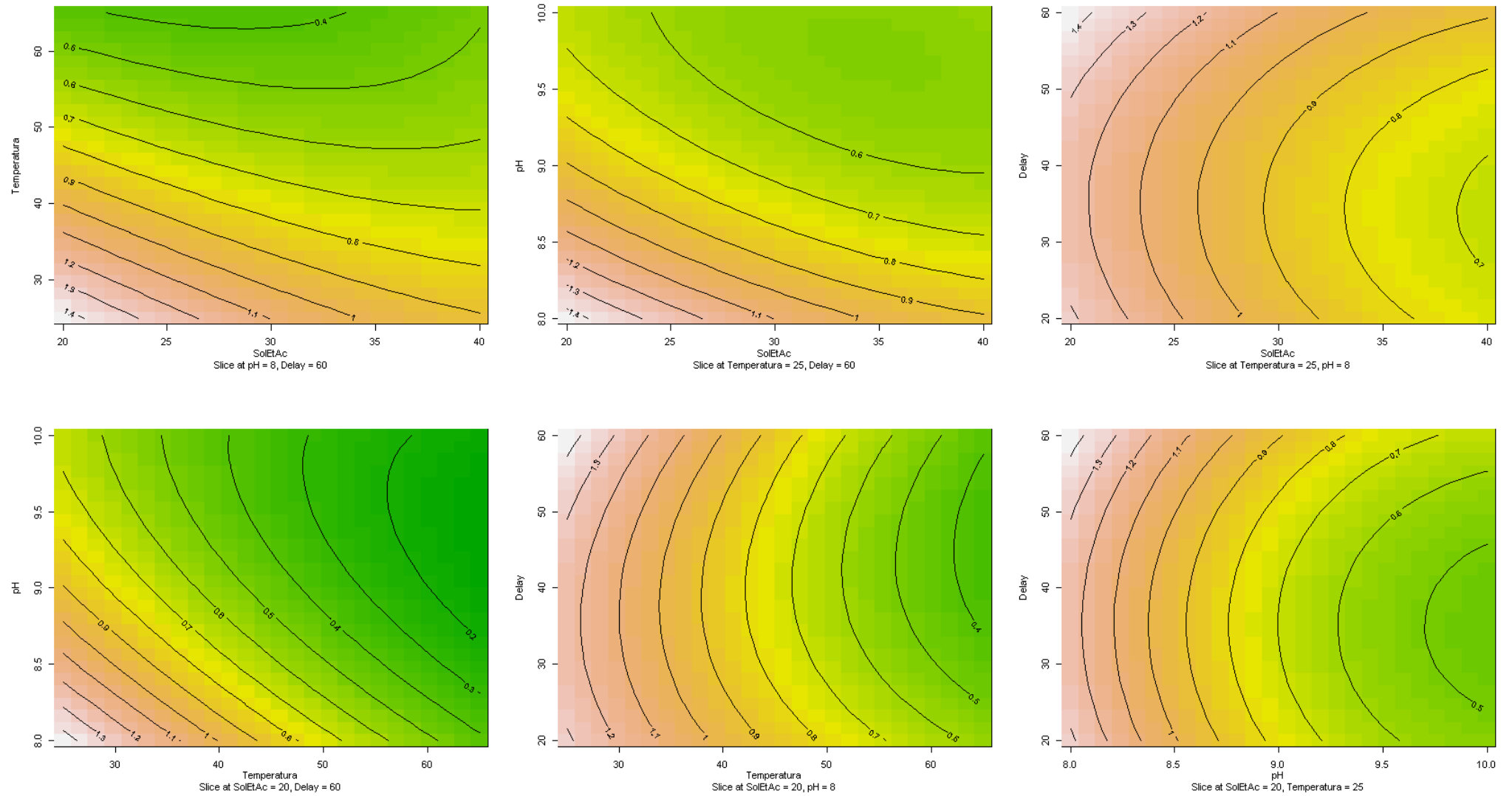
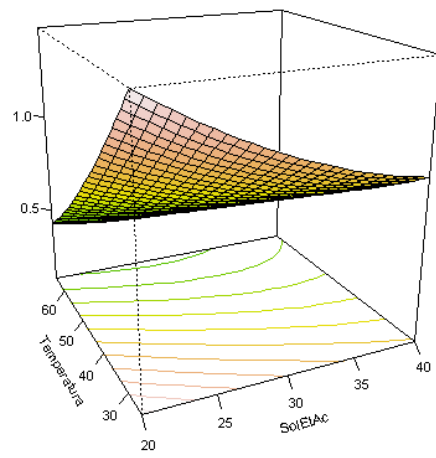
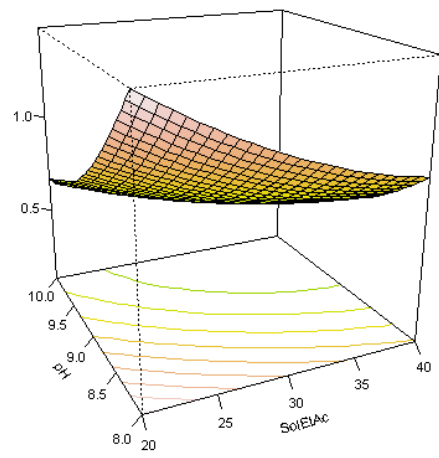


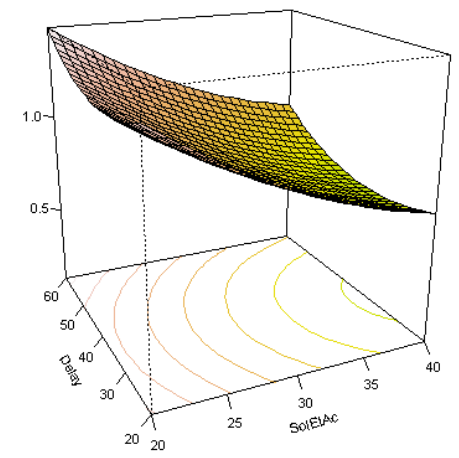
Figura 14. Matrices de contorno obtidas para o chumbo com cortes otimizados para o maior valor de SBR.



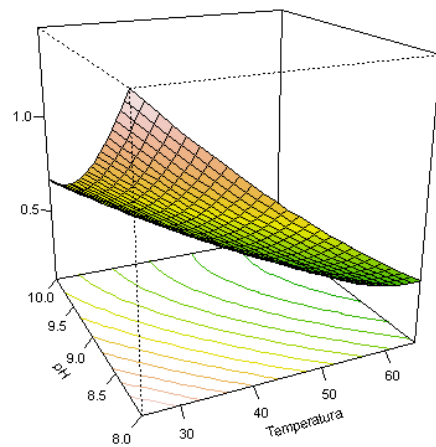
Slice at pH = 8, Delay = 60



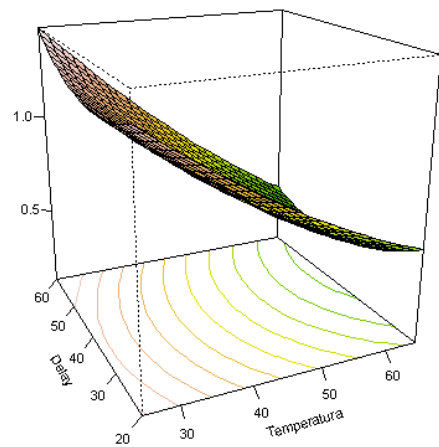
Slice at Temperatura = 25, Delay = 60



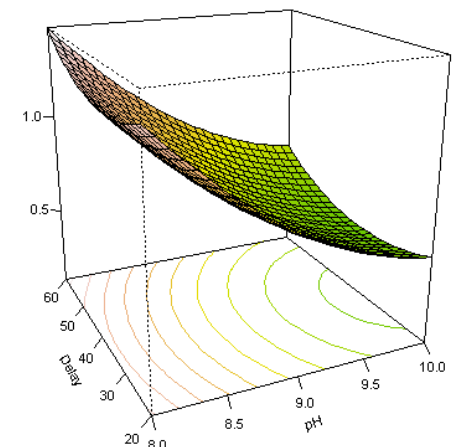
Slice at Temperatura = 25, pH = 8



Slice at SolEtAc = 20, Delay = 60



Slice at SolEtAc = 20, pH = 8



Slice at SolEtAc = 20, Temperatura = 25

Figura 15. Superfícies de resposta obtidas para o chumbo com cortes otimizados para o maior valor de SBR

Examinando a Tabela 5, observa-se que poucos coeficientes exibiram influência significativa na razão sinal-fundo e conseqüentemente na sensibilidade para os analitos. O chumbo, que sofreu maior influência, possui apenas dois parâmetros relevantes, a temperatura e o pH da solução de análise. Há ainda elementos que não foram significativamente afetados por nenhum parâmetro, como é o caso de cobalto, cromo e cobre.

Apesar de algumas superfícies de resposta aparentarem visualmente curvaturas, os parâmetros avaliados não apresentaram coeficientes significativos - em sua maioria - na regressão linear efetuada para predizer o comportamento do SBR para os elementos. A regressão linear é que gera um modelo matemático para predizer o SBR, de forma que as superfícies de resposta são estimativas gráficas. Visualmente não é possível determinar se as superfícies apresentam curvaturas significativas, para isso seria necessário a aplicação de um teste de curvatura global⁵⁷, não utilizado neste trabalho uma vez que os coeficientes da regressão linear já foram suficientes para evidenciar a pouca influência das variáveis do preparo de amostra no SBR para os elementos.

Com esse experimento, observa-se que no geral as variáveis do preparo de amostra estudadas pouco influenciaram a sensibilidade dos elementos nos níveis testados, sendo tal afirmação evidenciada pelos escassos coeficientes de regressão que se mostraram significativos, na Tabela 6. Essa observação pode, provavelmente, ser atribuída ao fato de que com as condições instrumentais otimizadas o plasma alcançado tenha sido robusto suficiente para degradar a matriz orgânica sem grande dependência das variáveis do preparo da amostra.

Em outras palavras, a opção de utilizar plasma robusto obteve êxito em proporcionar eficiência e sensibilidade de maneira praticamente independente das variáveis envolvidas no preparo de amostra. Dessa forma, este estudo fatorial forneceu evidência

concreta da robustez do método proposto, uma vez que sua sensibilidade para todos os elementos mostrou-se inalterada mediante pequenas variações do procedimento de tratamento das amostras.

4.3 Avaliação de efeitos de matriz

Tendo em vista que o preparo de amostras proposto não decompõe totalmente a matéria orgânica da matriz, foi preciso avaliar a presença de efeitos de matriz que pudessem permanecer mesmo com as otimizações já realizadas, ao ser utilizada uma calibração externa com soluções aquosas típicas, excluindo-se também a etanolamina e o ácido cítrico, a fim de não incluir na curva de calibração externa algum efeito que esses compostos, eventualmente, pudesse causar.

No processo do preparo de amostras, a proporção de diluição da amostra é provavelmente o fator que maior impacta sobre o efeito de matriz observado para os elementos, uma vez que uma diluição menor, apesar de proporcionar concentrações mais elevadas dos elementos, implica em mais quantidade de matriz sendo levada ao plasma e, assim, em maior consumo da energia disponível no atomizador, que é o próprio plasma.

Nesse contexto, realizou-se um estudo para avaliar a influência de três proporções de diluição diferentes sobre o efeito de matriz, medido pela diferença de inclinação entre a curva analítica utilizando-se sobreposição de matriz e uma curva analítica com padrões aquosos.

A Figura 16 ilustra, comparativamente para cada elemento, a diferença de inclinações entre as curvas analíticas aquosas (em preto) e de sobreposição de matriz (em vermelho). As linhas numéricas (1, 2, 3, 4 e 5) representam, respectivamente, Cd, Co, Cr, Cu e Pb e as colunas (a), (b) e (c) representam, respectivamente, (1_{leite}: 1_{sol. diluente}), (1_{leite}: 1,5_{sol. diluente}), (1_{leite}: 2_{sol. diluente}), em volume.

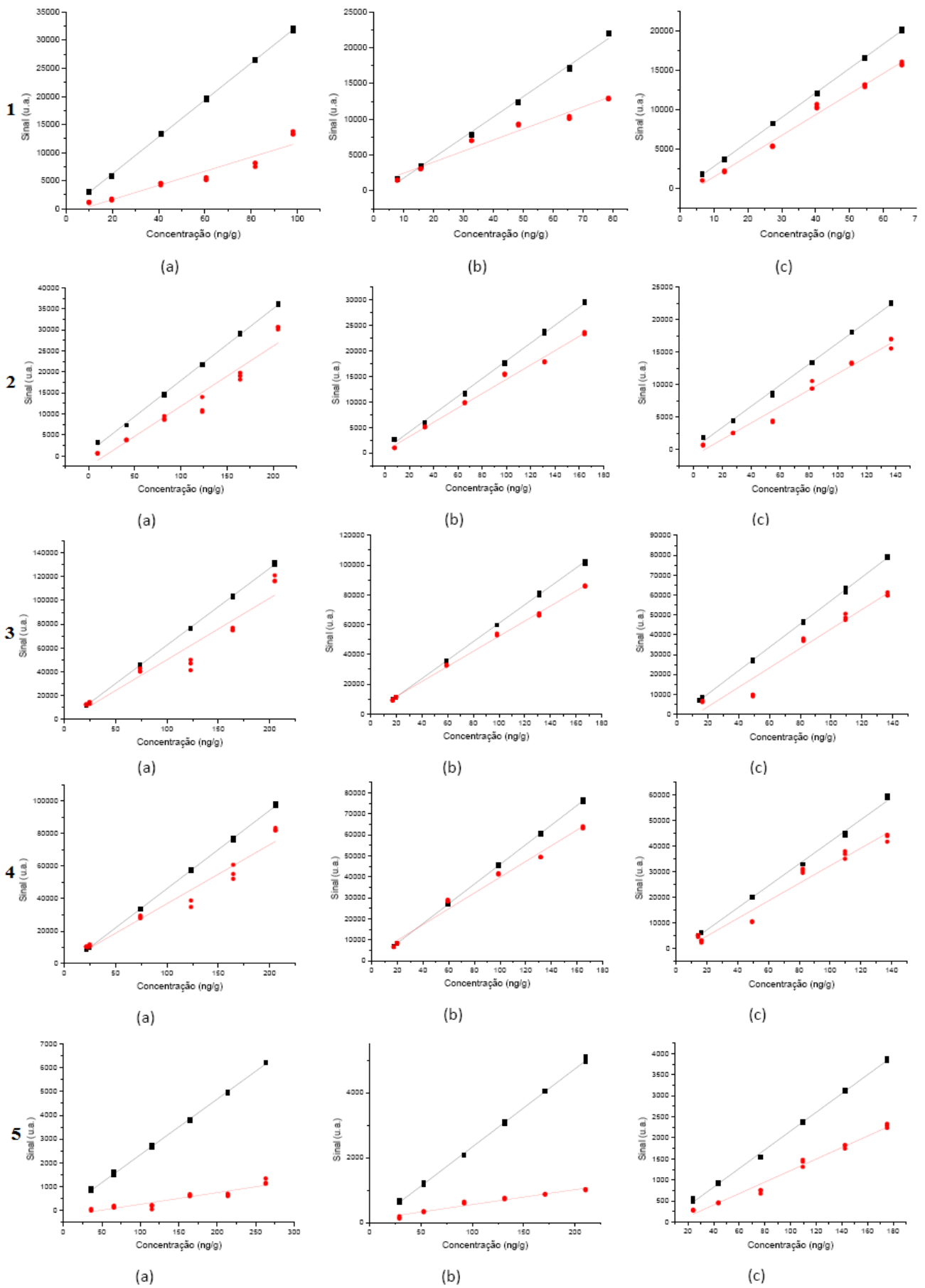


Figura 16. Comparação de curvas analíticas aquosas e com sobreposição de matriz para os diferentes elementos e para diferentes proporções de diluição da amostra. Nota: os sinais são referentes às mesmas linhas de emissão da tabela 4

As curvas da Figura 16 indicam que inicialmente, na proporção de diluição (1:1), o efeito da matriz foi bastante significativo para cádmio e chumbo. Porém, com o aumento da proporção da diluição, o efeito da matriz é praticamente eliminado para cádmio e significativamente reduzido para chumbo. Para os outros elementos, o efeito da matriz é menos pronunciado e o aumento da diluição também favorece, em geral, sua diminuição ou desaparecimento.

Para mensurar o efeito de matriz, optou-se por calcular a diferença relativa (DR) entre os coeficientes angulares das curvas analíticas aquosas e com sobreposição da matriz para cada elemento e proporção de diluição distintos. A DR foi calculada pela equação abaixo:

$$DR (\%) = \frac{\beta_{1,aquosa} - \beta_{1,leite}}{\beta_{1,aquosa}} \times 100$$

Equação 2. Cálculo da diferença relativa entre os coeficientes angulares das curvas analíticas (aquosa e com sobreposição de matriz) para a determinação de metais em leite cru.

onde $\beta_{1,aquosa}$ é o coeficiente angular da curva analítica aquosa e $\beta_{1,leite}$ é o coeficiente angular da curva de sobreposição de matriz.

Na Tabela 7 estão contidos os valores de diferença relativa calculados entre os coeficientes angulares das curvas analíticas em meio aquoso e com sobreposição de matriz.

Tabela 7. Diferenças relativas entre as curvas analíticas aquosas e com sobreposição de matriz obtidas para diferentes proporções de diluição da amostra.

Diferença relativa entre as curvas analíticas em meio aquoso e com sobreposição de matriz			
Elementos	(1 leite:1 diluente)	(1 leite:1,5 diluente)	(1 leite:2 diluente)
Cd	61,7%	45,7%	15,5%
Co	16,4%	19,4%	21,9%
Cr	19,8%	18,1%	16,8%
Cu	24,6%	19,9%	20,3%
Pb	79,0%	80,9%	38,6%

Observando-se os resultados da Tabela 7 é possível notar que os elementos estudados ainda possuem efeitos da matriz quando a amostra é preparada na máxima diluição testada (1 leite:2 diluente). No entanto, na grande maioria dos casos houve redução do efeito com o aumento da diluição da amostra, com destaque para chumbo e cádmio, que apresentaram melhorias drásticas, na ordem de 50%. Sendo assim, optou-se por trabalhar com a proporção de diluição (1:2) e realizar todas as calibrações utilizando sobreposição de matriz.

Embora esta forma de calibração, aqui escolhida, não seja a mais desejável para procedimentos de controle, sabe-se que os laboratórios da Embrapa têm acesso a amostras de leite isentas de contaminação (“amostras brancas”). Desta forma, este tipo de calibração é viável e possibilita evitar o uso de um procedimento de mineralização, no qual a diluição da amostra seria ainda maior, prejudicando os limites de detecção.

Nesse contexto, vale ressaltar que a proporção de diluição selecionada para a amostra, além de reduzir os efeitos da matriz e aumentar a sensibilidade do método (por meio da obtenção de sinais

mais intensos), possibilitou atingir limites de quantificação menores do que aqueles na condição de diluições menores. Além disso, com a diluição inicialmente utilizada - na proporção (1:1) - o sistema de nebulização era afetado com a deposição de proteínas do leite e entupimentos em curto período de trabalho - cerca de 15 minutos. Para evitar o entupimento, era preciso a aspiração de uma solução de limpeza (SolEtAc 10% (v/v) pH 8,0) por 3 minutos entre cada amostra. Mas, com a nova proporção de diluição (1:2), não foram mais observados entupimentos em até um dia de trabalho (período testado), além de que a aspiração da solução de limpeza entre as amostras pôde ser feita por apenas 15 segundos.

As Figuras 17 e 18 (abaixo) mostram o aspecto do sistema de nebulização do equipamento para as duas proporções de diluição da amostra.



Figura 17. Sistema de nebulização com a proporção (1:1) de diluição das amostras durante uma medida.



Figura 18. Sistema de nebulização com a proporção (1:2) de diluição das amostras durante uma medida.

4.4 Avaliação das linhas de emissão e da utilização de padrão interno

Após os estudos de otimização das condições instrumentais e do tratamento de amostras, foi realizado um estudo para avaliar qual seria a linha de emissão mais adequada para cada elemento. Desse modo, foram feitas leituras de padrões em duas linhas de emissão para cada elemento. Os padrões foram preparados por sobreposição de matriz, sendo submetidos ao mesmo preparo de amostra proposto na Figura 3.

A Tabela 8 (abaixo) mostra os níveis de concentração dos padrões utilizados.

Tabela 8. Níveis de concentração utilizados para obtenção das curvas analíticas para cada elemento.

Níveis	Concentrações ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)				
	Cd	Co	Cr	Cu	Pb
1	6,54	6,57	14,2	14,3	27,4
2	19,6	28,5	36,1	36,2	43,8
3	32,7	50,3	72,2	72,4	60,3
4	45,8	72,2	105	105	76,7
5	58,8	94,1	138	138	93,1
6	72,0	116	171	171	110

As curvas analíticas obtidas para as linhas de emissão de cada elemento tiveram suas regressões avaliadas por meio de alguns parâmetros, contidos na Tabela 9, a seguir.

Tabela 9. Parâmetros avaliados de curvas analíticas obtidas para algumas linhas de emissão.

Elemento	λ (nm)	Faixa de Calibração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	LDM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	$R^2_{\text{ajus.}}$
Cd	214,440	6,54 - 72,0	1	6,54	0,9933
	228,802		2	6,54	0,9931
Co	228,616	6,57 - 116	2	6,57	0,9753
	238,892		3	6,57	0,9951
Cr	205,560	14,2 - 171	9	14,8	0,9899
	267,716		1	14,8	0,9947
Cu	324,752	14,3 - 171	1	14,3	0,9817
	327,393		3	14,3	0,9876
Pb	217,000	27,4 - 110	17	27,4	0,8760
	220,353		2	27,4	0,9902

É importante ressaltar que na Tabela 9, o limite de detecção do método (LDM) foi calculado através da multiplicação da concentração correspondente ao desvio padrão obtido para o elemento em dez leituras do branco ($SD_{B,10}$) por 3,143 (t unilateral para 99% de confiança), conforme descrito na literatura^{58,59}. Já para o limite de quantificação, optou-se por defini-lo como sendo igual ao primeiro nível de concentração da curva analítica.

O motivo da definição do limite de quantificação como sendo o primeiro ponto da curva partiu da finalidade específica do método: aplicação em programas regulatórios. Tal aplicação demanda grande critério analítico, como, por exemplo, garantir um limite de quantificação bem definido e com segurança contra resultados falso negativos, o que sem dúvida pode ser obtido através da prática adotada de considerar como tal limite apenas um ponto efetivamente contemplado na curva analítica.

Para testar a hipótese de que haveria uma melhoria nas curvas analíticas caso se utilizasse padrão interno, foram preparadas curvas

analíticas idênticas porém com adição de ítrio como padrão interno. Os resultados estão na Tabela 10, a seguir.

Tabela 10. Parâmetros avaliados de curvas analíticas obtidas para algumas linhas de emissão utilizando Y (371,029nm) a uma concentração de 65,95 ng.mL⁻¹ como padrão interno.

Elemento (PI)	λ (nm)	Faixa de Calibração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	LDM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	R ² ajus.
Cd (Y)	214,440	6,54 - 72,0	1	6,54	0,9938
	228,802		1	6,54	0,9912
Co (Y)	228,616	6,57 - 116	2	6,57	0,9723
	238,892		3	6,57	0,9970
Cr (Y)	205,560	14,8 - 171	8	14,8	0,9930
	267,716		2	14,8	0,9975
Cu (Y)	324,752	14,3 - 171	4	14,3	0,9917
	327,393		3	14,3	0,9964
Pb (Y)	217,000	27,4 - 110	19	27,4	0,8853
	220,353		2	27,4	0,9900

Percebe-se que com a utilização do padrão interno, o parâmetros R² ajustado e LDM foram melhorados, no geral, de maneira discreta. Desse modo, todas as opções testadas - com excessão da linha 217,000 nm para chumbo - são possíveis de serem utilizadas independente do uso do PI.

É importante ressaltar que não foram observados benefícios significativos com a utilização de ítrio como padrão interno, havendo inclusive o aumento de alguns limites de detecção, no caso de Cr (267,716 nm), Cu (324,752 nm) e Pb (217,000 nm). Dessa forma, não recomenda-se a utilização deste elemento como padrão interno, pois não promove benefícios significantes e a adição de padrão interno representa uma etapa a mais na análise, implicando em aumento da

manipulação da amostra e eventual chance de sua contaminação, aumento de custo do método e diminuição da frequência analítica.

Para avaliar a melhor linha de cada elemento, realizou-se um estudo de exatidão do método, visando determinar quais das opções acima se mostrariam mais adequadas.

4.5 Estudos de exatidão

A exatidão do método foi avaliada por meio de experimentos de adição e recuperação de analitos, ou seja, considerando a diferença entre o resultado experimental obtido para uma amostra e o valor de referência, que foi a concentração de fortificação de uma matriz branca.

Para este estudo, 6 amostras de leite cru (consideradas isentas de contaminação pela Embrapa Gado de Leite) foram fortificadas em um nível de concentração correspondente ao ponto 3 (vide Tabela 8) das curvas analíticas dos elementos. Na Tabela 11 (a seguir) estão representadas as recuperações médias obtidas para cada elemento, para cada uma das linhas de emissão testadas e com a utilização de padrão interno ou não.

Tabela 11. Valores médios de recuperação obtidos para os elementos com diferentes linhas de emissão e com a utilização ou não de padrão interno.

Elemento	λ (nm)	PI	Faixa de Calibração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Recuperação
Cd	214,440	-	6,54 - 72,0	97,3%
		Y		94,8%
	228,802	-		93,6%
		Y		91,3%
Co	228,616	-	6,57 - 116	73,9%
		Y		71,5%
	238,892	-		80,9%
		Y		79,0%
Cr	205,560	-	14,8 - 171	68,7%
		Y		67,2%
	267,716	-		103,4%
		Y		100,5%
Cu	324,752	-	14,3 - 171	96,2%
		Y		93,5%
	327,393	-		64,2%
		Y		62,7%
Pb	220,353	-	27,4 - 110	77,3%
		Y		75,7%

Pode-se observar na Tabela 11 que, com exceção da linha de emissão de 267,716 nm para o cromo, as melhores recuperações foram obtidas sem a utilização do padrão interno.

Considerando a característica multielementar do método, é preciso escolher a melhor condição, no geral, para todos os analitos. Diante disso, optou-se por não utilizar padrão interno e utilizar para Cd, Co, Cr, Cu e Pb as seguintes linhas de emissão, respectivamente, 214,440nm, 238,892nm, 267,716nm, 324,752nm e 220,353nm.

Salienta-se que, nas condições escolhidas, três elementos - Cd, Cr e Co - apresentaram recuperações entre 95 e 105%, faixa considerada bastante adequada a métodos quantitativos. Para Pb e Co, as recuperações ficaram em torno de 80%, o que pode ser

considerado satisfatório levando-se em conta os níveis de concentração envolvidos, da ordem de $\mu\text{g.L}^{-1}$. Dessa forma, é possível considerar o método satisfatoriamente adequado a fins quantitativos⁶⁰.

4.6 Estudos de precisão

Visando avaliar a precisão do método para a quantificação dos elementos utilizando-se as todas as condições ótimas, foi realizado um ensaio em que o nível 3 (vide Tabela 8) da curva de calibração por sobreposição de matriz foi analisado pelo equipamento vinte vezes e ao final do processo, foram calculados os desvios relativos das concentrações encontradas.

A Tabela 12 (a seguir) apresenta os valores de desvios relativos encontrados para cada elemento.

Tabela 12. Desvios relativos percentuais encontrados para cada elemento em vinte medidas no nível 3 da curva analítica.

Elemento	Desvio Relativo (%)
Cd	1,69
Co	0,39
Cr	0,75
Cu	1,34
Pb	1,96

A análise da Tabela 12 permite observar que, para todos os elementos os valores de desvios relativos encontrados são bastante satisfatórios, todos abaixo de 2%, o que evidencia uma boa precisão exibida pelo método proposto.

5 Conclusões

O método inicialmente proposto sofreu ao longo do trabalho diversas otimizações que o permitiram, ao final, apresentar as características almeçadas desde o início do presente trabalho: portabilidade a processos de rotina, elevada frequência e desempenho analíticos e sensibilidades compatíveis com processos regulatórios.

Com relação à frequência analítica, o preparo de amostra estabelecido demanda de um analista treinado cerca de meio minuto por amostra, enquanto que a leitura instrumental leva cerca de dois minutos por amostra (incluindo 15 segundos de lavagem do sistema de nebulização antes de cada amostra). Dessa forma, um lote de cem amostras deve levar, em média, quatro horas para ser analisado. Vale ressaltar que o equipamento de ICP-AES utilizado é do tipo sequencial; considerando-se um equipamento simultâneo o tempo de leitura por amostra seria menor e, conseqüentemente, a frequência analítica seria ainda maior.

As figuras de mérito avaliadas demonstraram que o método estabelecido, em suas condições finais, é preciso e exato, exibindo valores de recuperação e variabilidade adequados à finalidade regulatória, almejada desde o início.

Diante disso, por meio do presente trabalho estabeleceu-se um método analítico para determinar Cd, Co, Cr, Cu e Pb em leite cru com potencial de aplicação em larga escala, ou seja, em processos de rotina e ainda com um desempenho analítico compatível com finalidades regulatórias. Grupos ou instituições que necessitem determinar tais elementos em leite cru terão neste trabalho um ponto de partida com condições instrumentais e de preparo de amostras bem determinadas, podendo apenas reproduzi-lo e submetê-lo a um processo de validação “*in house*”, mais expedito.

REFERÊNCIAS

1. 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 Chem.* **111**, 243-248 (2008).
2. LARSON, B. L. *Lactation*. (The Iowa State University Press, 1985).
3. Anvisa interdita lotes de leite longa vida. *Proteste* (2007). at <<http://www.proteste.org.br/bebidas/anvisa-interdita-lotes-de-leite-longa-vida-s454621.htm>>
4. Preso em MG, dono de laticínio é indiciado por novo caso de adulteração do leite. *JusBrasil* (2010). at <<http://folha-online.jusbrasil.com.br/noticias/2200591/preso-em-mg-dono-de-laticinio-e-indiciado-por-novo-caso-de-adulteracao-do-leite>>
5. Polícia Federal indicia os responsáveis pela Lac por suspeita de adulteração e falsificação de produto alimentício. *Direito Cidadão* (2011). at <http://direitocidadao.com.br/ver_noticia.php?codigo=5119>
6. SÁEZ-PLAZA, P., MICHAŁOWSKI, T., NAVAS, M. J., ASUERO, A. G. & WYBRANIEC, S. An Overview of the Kjeldahl Method of Nitrogen Determination. Part I. Early History, Chemistry of the Procedure, and Titrimetric Finish. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **43**, 178-223 (2013).
7. China dairy products found tainted with melamine. *BBC News* (2009). at <<http://www.bbc.co.uk/news/10565838>>
8. Qualidade do leite brasileiro dificulta exportações. *EXAME* (2010). at <<http://exame.abril.com.br/brasil/noticias/qualidade-leite-brasileiro-dificulta-exportacoes-598483>>
9. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, B. Produção integrada no Brasil : agropecuária sustentável alimentos seguros. (2008).

- 10.SOUZA, M. V., VIANNA, M. W. S., ZANDIM, B. M., FERNANDES, R. B. A. & FONTES, M. P. F. Metais pesados em amostras biológicas de bovinos. *Ciênc. Rural* **39**, 1774-1781 (2009).
- 11.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. *Sci. Total Environ.* **264**, 127-139 (2001).
- 12.BARAKAT, M. A. New trends in removing heavy metals from industrial wastewater. *Arab. J. Chem.* **4**, 361 - 377 (2011).
- 13.JÄRUP, L. Hazards of heavy metal contamination. *Br. Med. Bull.* **68**, 167-182 (2003).
- 14.KUNO, R. et al. Lead concentration in blood samples of humans and animal near an industrial waste dump in São Paulo, Brazil. *Vet. Hum. Toxicol.* 249-250 (1999).
- 15.SWARUP, D., PATRA, R., NARESH, R., KUMAR, P. & SHEKHAR, P. Blood lead levels in lactating cows reared around polluted localities; transfer of lead into milk. *Sci. Total Environ.* **347**, 106-110 (2005).
- 16.DUARTE, R. P. S. & PASQUAL, A. Avaliação do cádmio (Cd), chumbo (Pb), Níquel (Ni) e zinco (Zn) em solos, plantas e cabelos humanos. *Energ. Na Agric.* **15**, 46-48 (2000).
- 17.WEI, B. & YANG, L. A review of heavy metal contaminations in urban soils, urban road dusts and agricultural soils from China. *Microchem. J.* **94**, 99 - 107 (2010).
- 18.BRASIL. Ministério da Agricultura, P. e A. Instrução Normativa nº 42 de 20 de dezembro de 1999. *Diário Of. União* (1999).
- 19.Alimentarius, C. in *Codex Alimentarius Commission: Procedural Manual* 170 (FAO, 1997).
- 20.TAJKARIMI, M. et al. Lead residue levels in raw milk from different regions of Iran. *Food Control* **19**, 495-498 (2008).
- 21.KLAVERKAMP, F., PALACE, V., BARON, C., EVANS, R. & WAUTIER, G. Cumulative effects of multiple contaminants on caged fish. *Water Qual. Res. J. Can.* **41**, 244-255 (2006).

22. APPENROTH, K.-J. in *Soil Heavy Metals* 492 (Springer, 2010).
23. EL SAYED, 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 Addit. Contam. Part B Surveill.* **4**, 294-298 (2011).
24. 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 Chem.* **129**, 7 - 12 (2011).
25. SILVA, C. M. *et al.* Stable Lead in Milk and Derivates. *Food Anal. Methods* **3**, 85-89 (2010).
26. JAWOROWSKI, Z. Radioactive lead in the environment and in the human body. *Energy Rev* **7**, 3-45 (1969).
27. SILVA, C. M. *et al.* Lead Poisoning Risk for Dairy Cows in the Semi-Arid Region of Pernambuco, Brazil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **86**, 199-202 (2011).
28. SANTOS Jr., J., CARDOSO, J., SILVA, C., SILVEIRA, S. & AMARAL, R. Determination of radionuclides in environment using gamma-spectrometry. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **269**, 451-455 (2006).
29. JAVED, I. *et al.* Heavy metal residues in the milk of cattle and goats during winter season. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **82**, 616-620 (2009).
30. ARAUJO, U. C., PIVETTA, F. R. & MOREIRA, J. C. Avaliação da exposição ocupacional ao chumbo: proposta de uma estratégia de monitoramento para prevenção dos efeitos clínicos e subclínicos. *Cad. Saúde Pública* **15**, 123 - 132 (1999).
31. MATTOS, U. A. de O. *et al.* Avaliação e diagnóstico das condições de trabalho em duas indústrias de baterias chumbo-ácidas no Estado do Rio de Janeiro. *Ciênc. Saúde Coletiva* **8**, 1047 - 1056 (2003).
32. LAURENT, C., FEIDT, C. & LAURENT, F. *Contamination des sols: transferts des sols vers les animaux.* (Les Ulys & Angers: EDP Sciences & ADEME Ed, 2005).

- 33.ALLOWAY, B. *Heavy metals in soils*. (Glasgow: Chapman & Hall, 1995).
- 34.STERCKEMAN, T., DOUAY, F., PROIX, N. & FOURRIER, H. Vertical distribution of Cd, Pb and Zn in soils near smelters in the North of France. *Environ. Pollut.* **107**, 377 - 389 (2000).
- 35.KAMKAR, A., NOUDOOST, B., NABI BIDHENDI, G., ESMAEILI BIDHENDI, M. & MOZAFFARI NEJAD, A. Monitoring of heavy metals in raw milk of vet husbandries in industrial regions of Isfahan province of Iran. *Asian J. Chem.* **22**, 7927-7931 (2010).
- 36.QIN, L.-Q., WANG, X.-P., Li, W., TONG, X. & TONG, W.-J. The Minerals and Heavy Metals in Cow's Milk from China and Japan. *J. Health Sci.* 300-305 (2009).
- 37.MICLEAN, M., CADAR, O., ROMAN, C. & TANASELIA, C. The influence of environmental contamination on heavy metals and organochlorine compounds levels in milk. *Environ. Eng. Manag. J.* **10**, 37-42 (2011).
- 38.ZODAPE, G., DHAWAN, V. & WAGH, R. Determination of metals in cow milk collected from Mumbai city, India. *Bionano Front.* (2011).
- 39.KIRA, C. S. & MAIHARA, V. A. Determination of major and minor elements in dairy products through inductively coupled plasma optical emission spectrometry after wet partial digestion and neutron activation analysis. *Food Chem.* **100**, 390 - 395 (2007).
- 40.CONI, E., BOCCA, A., IANNI, D. & CAROLI, S. Preliminary evaluation of the factors influencing the trace element content of milk and dairy products. *Food Chem.* **52**, 123 - 130 (1995).
- 41.AMARO-LÓPEZ, M. A., MORENO-ROJAS, R., SÁNCHEZ-SEGARRA, P. J. & Zurera-Cosano, G. Tratamiento de las matrices lácteas para la determinación de trazas metálicas por absorción atómica. *Alimentaria* 71-78 (1996).
- 42.HOENIG, M. & KERSABIEC, A.-M. de. Sample preparation steps for analysis by atomic spectroscopy methods: present status. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **51**, 1297 - 1307 (1996).

43. SUN, D.-H., WATERS, J. K. & MAWHINNEY, T. P. Determination of Thirteen Common Elements in Food Samples by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry: Comparison of Five Digestion Methods. *J. AOAC Int.* **83**, 1218-1224 (2000).
44. STURUP, S. & BUCHERT, A. Direct determination of copper and iodine in milk and milk powder in alkaline solution by flow injection inductively coupled plasma mass spectrometry. *Fresenius J. Anal. Chem.* **354**, 323-326 (1996).
45. A. NOBREGA, J., GELINAS, Y., KRUSHEVSKA, A. & M. BARNES, R. Direct Determination of Major and Trace Elements in Milk by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission and Mass Spectrometry. *J Anal Spectrom* **12**, 1243-1246 (1997).
46. PEIXOTO, R. R. A., OLIVEIRA, A. & CADORE, S. Multielemental determinations in chocolate drink powder using multivariate optimization and ICP OES. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 8117-8122 (2012).
47. DA SILVA, J. C. J. Determinação direta de constituintes inorgânicos em leite por ICP OES: comparação crítica do desempenho analítico em configuração de tocha axial e radial, usando uma mistura de aminas terciárias (CFA-C) como solvente. (UNICAMP, 2004).
48. SANTOS, D., NOGUEIRA, A., NEVES, E., CAVALHEIRO, D. & NOBREGA, J. Analysis of inorganic constituents in milk and simulation of CFA-C reagent. *Eclética Química* **27**, 61-76 (2002).
49. TOGNONI, E. *et al.* Combination of the ionic-to-atomic line intensity ratios from two test elements for the diagnostic of plasma temperature and electron number density in Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy. *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* **62**, 435-443 (2007).
50. DE SOUSA, R. A., BACCAN, N. & CADORE, S. Analysis of liquid stevioside and cyclamate-saccharin dietetic sweeteners by inductively coupled plasma optical emission spectrometry without sample treatment. *J. Braz. Chem. Soc.* **17**, 1393-1399 (2006).

51. VELITCHKOVA, N., VELICHKOV, S. & DASKALOVA, N. Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry - Optimization of the operating conditions in the determination of trace of elements in line-rich emission matrices. *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* **62**, 386-402 (2007).
52. MALDONADO, D. *et al.* Direct injection nebulizer with replaceable capillary for micro samples analysis by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry. *Microchim. Acta* **162**, 93-99 (2008).
53. MERMET, J. M. Use of magnesium as a test element for inductively coupled plasma atomic emission spectrometry diagnostics. *Anal. Chim. Acta* **250**, 85 - 94 (1991).
54. SANTOS, J. S. *et al.* Optimization of the operating conditions using factorial designs for determination of uranium by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Microchem. J.* **97**, 113-117 (2011).
55. DA LUZ LOPES, W., SANTELLI, R. E., OLIVEIRA, E. P., DE CARVALHO, M. d. F. B. & BEZERRA, M. A. Application of multivariate techniques in the optimization of a procedure for the determination of bioavailable concentrations of Se and As in estuarine sediments by ICP OES using a concomitant metals analyzer as a hydride generator. *Talanta* **79**, 1276-1282 (2009).
56. FROES, R. E. S. *et al.* Multivariate optimization by exploratory analysis applied to the determination of microelements in fruit juice by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* **64**, 619-622 (2009).
57. BOX, G. E. . & DRAPER, N. R. *Empirical model-building and response surfaces.* (Wiley, 1987).
58. INMETRO. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. (2003).

59. EURACHEM. The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. (1998).
60. BRITO, N. M., AMARANTE JR., O. Z., POLESE, L. & RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. *Rev. Ecotoxicologia E Meio Ambiente* **13**, 129-146 (2003).

APÊNDICE A – Protocolo analítico para a determinação de contaminantes inorgânicos em leite cru por ICP-AES

