

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

LUÍS GUSTAVO COFANI DOS SANTOS

**Confiabilidade metrológica da determinação de elementos  
tóxicos e essenciais em leite bovino de raças  
exploradas no Brasil**

Piracicaba

2009

LUÍS GUSTAVO COFANI DOS SANTOS

**Confiabilidade metrológica da determinação de elementos  
tóxicos e essenciais em leite bovino de raças exploradas no Brasil**

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear  
na Agricultura da Universidade de São Paulo  
para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Química na Agricultura e  
no Ambiente

Orientadora: Profa. Dra. Elisabete A. De Nadai  
Fernandes

Piracicaba

2009

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
**Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP**

Santos, Luís Gustavo Cofani dos

Confiabilidade metrológica da determinação de elementos tóxicos e essenciais em leite bovino de raças exploradas no Brasil / Luís Gustavo Cofani dos Santos; orientadora Elisabete A. De Nadai Fernandes. - - Piracicaba, 2009.

124 p.: il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Alimentos de origem animal
2. Análise por ativação neutrônica
3. Bovinocultura leiteira
4. Espectrometria de massas
5. Metrologia química I. Título

CDU 636.087.6:543.5

*Aos meus pais, Roseli e Roberto*

*À minha esposa, amiga e eterna companheira, Simone*

*À minha pequena Gabriela*

***DEDICO***

## **AGRADECIMENTOS**

ÀS INSTITUIÇÕES:

- ✓ Universidade de São Paulo (USP)
- ✓ Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da USP
- ✓ Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ) da USP
- ✓ Laboratório de Radioisótopos (LRi) do CENA
- ✓ Laboratório de Química Analítica do CENA
- ✓ Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) da USP
- ✓ Clínica do Leite da ESALQ
- ✓ Centro de Treinamento da ESALQ
- ✓ Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – Comissão Nacional de Energia Nuclear (IPEN/CNEN)
- ✓ Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)
- ✓ Comissão de Pós-Graduandos do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CPG/CENA)

AOS COLABORADORES:

- ✓ Profa. Dra. Elisabete A. De Nadai Fernandes, pela oportunidade, orientação, incentivo, confiança e amizade
- ✓ Prof. Dr. Gabriel Adrián Sarriés, Dra. Lucimara Blumer, Andrés Enrique Lai Reyes e MSc. Silvana Regina Vicino Sarriés pelas sugestões e auxílio na interpretação estatística
- ✓ Dr. Márcio Arruda Bacchi, Dr. Fábio Sileno Tagliaferro e Dr. Elvis Joacir De França, pelas contribuições

- ✓ Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior, Dra. Maria José Aguirre Armelin e Prof. Dr. Paulo Roberto Rodrigues Ramos, pelas sugestões no exame de qualificação
- ✓ Prof. Dr. Peter Bode, pela visita técnico-científica ao “Department of Radiation, Radionuclides & Reactor” (RRR), da “Delft University of Technology” (TUDelft), em Delft, Holanda, e sugestões
- ✓ Sra. Anneke Koster do RRR, pela atenção, paciência e valiosos ensinamentos
- ✓ Adriana de Angelis Fogaça e Cláudio Luiz Gonzaga, pela ajuda em prover materiais essenciais ao bom andamento da pesquisa
- ✓ Aline Albertini Paladini, Camila Elias, Vanessa Gonçalves Neris e Paula Sancinetti Modolo, pelo auxílio na realização de procedimentos laboratoriais
- ✓ Simone dos Santos, pelo inestimável auxílio nas coletas, procedimentos laboratoriais e sugestões
- ✓ Amigos e colegas do LRI, pelos momentos de convivência:

- Adriano Di Piero Filho	- Isabel P. O. Cavalca
- André Luis Lima de Araújo	- José Flávio Macacini
- Angela A. Ferrari	- Júlio César Marson
- Cássio Franco Moreira	- Leandro Camilli
- Christian Turra	- Lígia Maria de Aquino
- Claudiney Bardini Junior	- Lilian Seiko Kato
- Felipe Y. Fonseca	- Mariana Bossi Esteves
- Gabriela de Matuoka e Chiocchetti	- Tassiane C. Martins
- Gisele G. Bortoleto	- Vanderlei A. Stefanuto
- Gislaine Michele Manarin	- Vanessa Santos Rodrigues
- ✓ Prof. Dr. Francisco José Krug, pelos conselhos e por disponibilizar a infraestrutura do Laboratório de Química Analítica do CENA para digestão das amostras
- ✓ Profa. Dra. Maria Fernanda Giné-Rosías, pela colaboração
- ✓ Iolanda Aparecida Rufini (Tatinha), pela condução da digestão das amostras

- ✓ MSc. Lidiane Cristina Nunes e Dra. Lilian Cristina Trevizan Felipe, pelo auxílio no Laboratório de Química Analítica do CENA
- ✓ Prof. Dr. José Roberto Ferreira, pelos conselhos
- ✓ Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior da FCFRP, por disponibilizar a infraestrutura para analisar as amostras por ICP-MS
- ✓ Jairo Lisboa Rodrigues, Dr. Samuel Simião de Souza e, em especial, à Vanessa Cristina de Oliveira Souza, pelo auxílio analítico na FCFRP
- ✓ Dr. Marco Antônio Penati, Prof. Dr. Flávio Augusto Portela Santos e Prof. Dr. Wilson Roberto Soares Mattos, por permitirem que coletas fossem realizadas no Centro de Treinamento da ESALQ
- ✓ Estagiários do Centro de Treinamento da ESALQ, em especial à aluna Marina de Arruda Camargo Danés, pelo auxílio na coleta de leite de alguns animais do Centro de Treinamento da ESALQ
- ✓ Dra. Ana Carolina de Oliveira Rodrigues, pelos conselhos
- ✓ Sra. Marília Ribeiro Garcia Henyei, pelas correções das referências bibliográficas e elaboração da ficha catalográfica
- ✓ Aos motoristas do CENA
- ✓ Lia Bueno Moretti, pela colaboração

#### AOS FORNECEDORES DE AMOSTRAS:

- ✓ Sr. Disney, Sr. João, Sr. Luiz e Sr. Leonardo
- ✓ Sr. Daniel, Sr. Marco Túlio e Srt. Ana Paula
- ✓ Sr. Sidnei, Sr. Adnélson, Sr. Érico e Sr. Clóvis
- ✓ Proprietários das fazendas dos estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio Grande do Sul

*Aos meus pais, Roseli e Roberto,*

*À minha filha Gabriela*

*E especialmente à minha esposa, Simone,*

*pelo incentivo, sugestões, auxílio, disponibilidade*

*e, principalmente, compreensão pelas ausências*

*em momentos que deveriam ser de lazer, que,*

*no entanto, foram dedicados à elaboração*

*desse trabalho*

*Feliz é o dia em que aprendemos algo de novo*  
**Henrique Bergamin Filho**

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	11
<b>SUMMARY .....</b>	13
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	15
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	20
2.1 O LEITE BOVINO .....	20
2.2 A INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 51 .....	23
2.3 ELEMENTOS QUÍMICOS TÓXICOS E ESSENCIAIS EM LEITE .....	25
2.4 ANÁLISE POR ATIVAÇÃO NEUTRÔNICA INSTRUMENTAL .....	31
2.5 ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO .....	35
2.6 CONFIABILIDADE METROLÓGICA .....	36
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	43
3.1 AMOSTRAGEM .....	43
3.1.1 Leite comercial .....	43
3.1.2 Representatividade amostral .....	43
3.1.3 Estudo 1: Leite amostrado de tanques de resfriamento .....	46
3.1.4 Estudo 2: Leite amostrado de animais .....	49
3.1.5 Ração bovina .....	58
3.2 PREPARO DAS AMOSTRAS .....	58
3.2.1 Leite .....	58
3.2.2 Ração bovina .....	60
3.3 ANÁLISE QUÍMICA .....	61
3.3.1 Análise por ativação neutrônica instrumental .....	61

3.3.1.1 Encapsulamento .....	62
3.3.1.2 Irradiação .....	65
3.3.1.3 Detecção .....	67
3.3.1.4 Cálculo .....	70
3.3.2 Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado .....	73
3.3.2.1 Digestão .....	74
3.3.2.2 Determinações químicas .....	76
3.4 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DA QUALIDADE (INSTRUÇÃO NORMATIVA 51) .....	77
3.5 CONTROLE DA QUALIDADE DO PROCEDIMENTO ANALÍTICO .....	79
3.5.1 Exatidão dos resultados das análises .....	79
3.5.2 Reprodutibilidade ao longo dos estudos .....	79
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>81</b>
4.1 LEITE COMERCIAL .....	81
4.2 REPRESENTATIVIDADE AMOSTRAL .....	88
4.3 ESTUDO 1: LEITE ORIUNDO DE TANQUES DE RESFRIAMENTO .....	93
4.4 ESTUDO 2: LEITE ORIUNDO DE ANIMAIS .....	99
4.5 RAÇÃO BOVINA .....	105
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>110</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>116</b>

## RESUMO

**SANTOS, L.G.C. Confiabilidade metrológica da determinação de elementos tóxicos e essenciais em leite bovino de raças exploradas no Brasil.** 2009. 124 p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

O leite é um alimento completo. Contém micronutrientes, aminoácidos, ácidos graxos em proporções adequadas à nutrição humana. Sua composição pode ser simplificadamente dividida em água, lipídios, glicídios, proteínas e sais minerais. Todavia, a composição do leite não é absoluta. Fatores como raça, sistema de produção, alimentação e clima podem influenciar a qualidade do produto final. Os reflexos da globalização na agropecuária leiteira brasileira resultaram na implantação da Rede Brasileira de Laboratórios Centralizados da Qualidade de Leite (RBQL). A Instrução Normativa nº 51 (IN51), que faz parte do Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNMQL), aprovou os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte. Cabe à indústria leiteira brasileira, cujo leite é predominantemente oriundo das raças Holandesa, Gir, Girolanda, Jersey, Pardo Suíço e Guzerá, garantir a qualidade do produto comercializado. O desenvolvimento de um sistema de medição confiável é primordial no campo industrial, científico e comercial. Assim sendo, a proposta desse trabalho foi avaliar quimicamente marcas de leite comercial UHT bovino, com diferentes quantidades de gordura e de diferentes unidades federativas do Brasil comprados no comércio da cidade de Piracicaba SP e comparar os valores determinados com os reportados pelos fabricantes na tabela de “Informações Nutricionais” nas embalagens, além de investigar a potencialidade da INAA na quantificação química da matriz alimentar em questão. Outro objetivo desse trabalho foi comparar quimicamente o leite oriundo de tanques de resfriamento do estado de Minas Gerais com tanques de resfriamento do estado do Rio Grande do Sul e comparar quimicamente o leite amostrado

diretamente de animais de quatro propriedades do estado de São Paulo, fazendo inferências aos limites estabelecidos pela IN51, as legislações vigentes nacional e internacionalmente. Realizou-se também análise exploratória de algumas fontes de nutrientes na alimentação de gado bovino. Com os resultados, observou-se que a preparação das amostras e os procedimentos para a INAA foram empregados com sucesso para a determinação de Br, Ca, Co, Cs, Fe, K, Na, Rb e Zn. Em relação ao comparativo dos valores determinados com os valores declarados pelos fabricantes, Ca apresentou uma tendência dos valores medidos serem menores que os informados, diferentemente do ocorrido com o Na. Dos 16 elementos químicos quantificados pela INAA e ICP-MS, 10 apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) entre as propriedades rurais do estado de Minas Gerais e do estado do Rio Grande do Sul. Dos elementos químicos que foram quantificados pela INAA, Br, Cs, K e Rb já foram mencionados em trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Radioisótopos como importantes para a discriminação de sistema de produção de diversas culturas. Para o estudo do leite oriundo dos animais, os valores médios determinados para os parâmetros da qualidade, atendiam os limites estabelecidos pela IN51. Para os 16 elementos químicos determinados pela INAA e ICP-MS, Co e Mn foram os únicos em que não se verificaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as quatro propriedades pelo teste das comparações múltiplas de Tukey. Pela análise de agrupamento, constatou-se que a raça é primordial para a separação dos grupos, entretanto, o sistema de produção também deve ser levado em consideração. Em relação aos limites máximos de tolerância (LMT) estabelecidos pela legislação brasileira e que possuem valores específicos para leite, verificou-se que As não excedeu os limites máximos estabelecidos, contudo, atenção deve ser dada aos elementos químicos Cr e Se por possuírem valores médios superiores aos LMT. Através dos resultados das frações de massa de volumosos e concentrados, destinados à alimentação de gado bovino, foi possível diferenciar a matriz da fonte de nutriente, bem como a origem.

Palavras-chave: Leite. Elementos químicos tóxicos e essenciais. INAA. ICP-MS.

## SUMMARY

**SANTOS, L.G.C. Metrological reliability in determining toxic and essential elements in bovine milk of breeds exploited in Brazil. 2009.** 124 p. Thesis (Doctoral) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

Milk is a complete food. It contains micronutrients, aminoacids, and fatty acids in adequate amounts for human intake. In a simple way, its composition can be divided into water, lipids, lactose, proteins and mineral salts. The composition of milk, however, is not an absolute one. Features such as breed, production system, nourishment and climate can affect the final product quality. The reflex of globalization on the Brazilian dairy husbandry resulted in the creation of the Brazilian Network of Milk Quality Central Laboratories (Rede Brasileira de Laboratórios Centralizados de Qualidade de Leite - RBQL). The Normative Instruction 51 (IN51), a constituent part of the National Milk Quality Improvement Program (PNMQL) has approved the technical regulations of production, identity and quality of type-A milk, type-B milk, type-C milk, pasteurized milk, and refrigerated raw milk as well as the technical regulation for refrigerated raw milk collecting and transportation. The Brazilian dairy industry, with milk mostly deriving from breeds Holandesa, Gir, Girolanda, Jersey, Pardo Suiço and Guzera, is in charge of insuring the quality of the commercialized product. Developing a reliable measuring system is essential in the industrial, scientific and commercial fields. Thus, the aim of this work is to chemically evaluate the brands of commercial UHT bovine milk with different amounts of fat and from different states of Brazil, purchased in the city of Piracicaba, state of São Paulo, and compare the established values with those informed by the manufacturers in the "Nutritional Facts" table in the packages labels, in addition to investigating the INAA potentiality in the chemical quantification of the respective feeding matrix. Another

goal was to chemically compare the milk deriving from cooling tanks in the state of Minas Gerais and those from cooling tanks in the state of São Paulo, thus inferring on the limits established by the IN51, the national and international legislations in force. Also an exploratory analysis of a few nutrient sources of bovine cattle feeding was observed. The results indicated that the sample preparation and INAA procedures were successfully employed to determine Br, Ca, Co, Cs, Fe, K, Na, Rb and Zn. As to the comparison between the established values and those stated by the manufacturers, the Ca values tended to be lower than the informed ones, unlike what happened to Na. Out of 16 chemical elements quantified by INAA and ICP-MS, 10 showed significant differences ( $p < 0.01$ ) between the rural properties in the state of Minas Gerais and those in the state of Rio Grande do Sul. Out of the chemical elements quantified by INAA, Br, Cs, K and Rb have already been pointed in works developed at the Laboratory of Radioisotopes as important to discriminate the production system of several crops. In the study of animal-derived milk, the mean values determined for the quality parameters met the limits established by the IN51. For the 16 chemical elements determined by INAA and ICP-MS, Co and Mn were the only ones showing no significant differences ( $p < 0.05$ ) among all four properties by the Tukey multiple comparison test. Through the cluster analysis the breed was verified to be essential to the separation of groups, however, the production system is also to be taken into account. As to the maximum tolerance limits (MTL) established by the Brazilian legislation and having specific values for milk, the As did not exceed the maximum limits established, yet, attention must be paid to Cr and Se since their mean values are beyond the MTL. The mass fraction results determined in roughages and concentrates for bovine cattle feeding made possible the distinction of the nutrient source matrix and their origin.

Keywords: Milk. Toxic and essential chemical elements. INAA. ICP-MS.

## 1 INTRODUÇÃO

O setor lácteo brasileiro é um dos agronegócios mais importantes do país. Estima-se que, somente na produção primária, trabalhem mais de 3,5 milhões de pessoas. A atividade é praticada em todo o território nacional, em mais de 1 milhão de propriedades rurais, sendo que sua produção se dá pela exploração de raças puras e mestiças. De um modo geral, as raças puras taurinas européias são especializadas na produção de leite, desde que recebam manejo adequado. Por outro lado, as raças puras zebuínas possuem menor potencial de produção, entretanto, são mais resistentes e adaptáveis a possíveis adversidades no manejo. Dessa forma, a utilização de animais “meio-sangue” europeu x zebu ( $F_1$ ) torna-se uma alternativa viável para produtores que não têm condições de prover manejo de uma raça pura especializada (TEODORO, 2006).

Pelo levantamento da produção de leite das cinco regiões brasileiras entre os anos de 1998 e 2007, constatou-se que nesse período a região Sudeste é a maior produtora, seguido pela região Sul, Centro-Oeste, Nordeste e Norte (ZOCCAL, 2009b). Entre os anos de 2000 e 2003, apesar do número de produtores ter reduzido em mais de 20 %, as exportações no setor lácteo cresceram 430 % (ALVIM, 2003). Entre os meses de janeiro a dezembro de 2007, as exportações de lácteos foram expressivas, totalizando US\$ 299,5 milhões (CANALDOPRODUTOR, 2008). Nesse mesmo ano, o Brasil foi responsável por 4,75 % da produção mundial de leite bovino (FAOSTAT, 2009). Através do último levantamento realizado pelo site MilkPoint, os 100 maiores produtores do Brasil em 2008 produziram aproximadamente 6 % a mais de leite do que os 100 maiores do ano de 2007, sendo que 70 % dos produtores pretendem aumentar a produção (MILKPOINT, 2009).

O leite pode ser basicamente dividido em água, lipídios, glicídios, proteínas e sais minerais. Sua síntese ocorre na glândula mamária sob controle hormonal. Muitos dos constituintes são sintetizados nas células secretoras e alguns são adicionados ao leite diretamente a partir do sangue e do epitélio glandular. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2009), as informações nutricionais de uma porção de 200 mL de leite integral longa vida pasteurizado, com os respectivos valores diários de referência, baseados numa dieta de 8400 kJ diários (ou 2000 calorias) são:



valor calórico = 6 %  
carboidratos = 3 %  
proteínas = 9 %



gorduras totais = 12 %  
gorduras saturadas = 20 %  
sódio = 4 %

O Ministério da Saúde recomenda que o consumo mínimo de leite deve ser de 400 mL/dia para crianças de até 10 anos, 700 mL/dia para jovens entre 11 e 19 anos e 600 mL/dia para adultos acima de 20 anos, incluindo idosos. Assim sendo, o consumo recomendado seria 146 L/ano, 256 L/ano e 219 L/ano, respectivamente, para os três grupos mencionados (ZOCCAL, 2009a).

Os leites fluidos disponíveis no mercado são os leites tipo A, tipo B, tipo C e UHT. O tipo A procede de granjas leiteiras, onde é pasteurizado e envasado sem contato manual, o tipo B procede de propriedade rural, onde é mantido resfriado para posterior envio às usinas de beneficiamento para pasteurização e envase em, no máximo, 2 h após a recepção, enquanto o leite tipo C também procede de propriedade rural e deve ser pasteurizado e envasado em até 5 h após a recepção. O processo de pasteurização consiste no aquecimento do leite entre 72 °C a 75 °C por 15 a 20 segundos. No UHT (*Ultra High Temperature*), o leite permanece por 2 a

4 segundos à temperatura entre 130 °C e 150 °C, com um resfriamento súbito à temperatura inferior a 32 °C. Posteriormente, ocorre o envase sob condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas.

Sob o aspecto socioeconômico, o agronegócio lácteo proporciona melhoria na distribuição de renda, pois aumenta os postos de trabalho, particularmente nos países que estão em processo de desenvolvimento. Com a globalização do mercado e a formação de grandes blocos econômicos, barreiras tarifárias têm dado lugar a barreiras técnicas. A IN51, que faz parte do Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNMQL), de 18 de setembro de 2002, sancionada pelo então Ministro da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Marcus Vinicius Pratini de Moraes, aprovou os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte (MARTINS, 2003b). Essa medida, que entrou em vigor em 1 de julho de 2005, tornou compulsória a análise da qualidade do leite tanto para indústrias quanto para pecuaristas. Entretanto, os limites estabelecidos estão sendo modificados gradativamente até se equipararem aos padrões adotados internacionalmente.

No estado de São Paulo, o único laboratório credenciado para realizar este controle é a Clínica do Leite, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), que teve sua capacidade analítica ampliada, podendo analisar todo o leite dos estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e parte de Mato Grosso do Sul e de Goiás. As análises englobam contagem de células somáticas (CCS), contagem bacteriana total (CBT), verificação da presença de resíduos de antibióticos (ATB), índice crioscópico máximo,

determinação de gordura, proteína, lactose, sólidos totais, extrato seco desengordurado e nitrogênio uréico (CASSOLI; MACHADO, 2007).

Os sais minerais presentes na constituição do leite desempenham importantes funções biológicas no organismo humano. Citam-se, como exemplo, os produtos lácteos, considerados como principais fontes de Ca na alimentação. Por outro lado, dependendo da forma como a produção do leite for conduzida, ele pode ser portador de elementos químicos considerados nocivos à saúde. A IN51 informa que contaminantes orgânicos e inorgânicos eventualmente presentes no leite não devem superar os limites máximos estabelecidos pela legislação específica, Portaria nº 685, de 27 de agosto de 1998 (ANVISA, 1998). Contudo, especificamente para o leite há informativos de limites máximos de tolerância (LMT) apenas para As (0,1 ppm) e Pb (0,05 ppm). Para os demais elementos químicos apresentados pelo Decreto nº 55.871, de 26 de março de 1965 (ANVISA, 1965), o leite está enquadrado como “outros alimentos”. Internacionalmente, a *FAO/IAEA Training and Pesticide Center* (FAO/IAEA, 1998) também estabeleceu níveis para alguns metais tóxicos que devem ser observados em alimentos, porém, não há nenhum valor específico para o leite. O consumidor de hoje é mais exigente que no passado, aspectos como leite saudável, rico em nutrientes, com grande valor biológico e sem riscos à saúde são cada vez mais requisitados (LICATA et al., 2004). Assim sendo, não é surpreendente o crescente interesse na determinação de elementos químicos essenciais com propósitos nutricionais e de elementos tóxicos. O não acompanhamento dessa nova tendência mundial acarretaria problemas não somente econômicos ao setor leiteiro brasileiro, mas principalmente à saúde da população que consome o produto e seus derivados.

Neste contexto, aspectos relacionados com metrologia, normalização e qualidade tornam-se essenciais. A globalização do comércio requer conciliação de normas e procedimentos, para que seja possível o estabelecimento de padrões e sistemas de harmonização equivalentes. O desenvolvimento de um sistema de medição único e confiável é primordial no campo industrial, científico e comercial. Além disso, um sistema nacional de medição consistente e com credibilidade facilita a aceitação de produtos em mercados externos, podendo reduzir ou até eliminar testes redundantes no comércio. Neste particular, a análise por ativação neutrônica instrumental (INAA), pelas características de elevado rigor metrológico, é considerada como método de razão primário (BODE et al., 2000). Em 2007, durante a 13<sup>ª</sup> Reunião Anual do *Consultative Committee for Amount of Substance: Metrology in Chemistry* (CCQM), a NAA foi oficialmente reconhecida como método primário de medição (BIPM, 2007).

Diversas variáveis influenciam a composição química do leite produzido no Brasil – diferentes sistemas de produção (confinamento, semi-confinamento e pastagem), diferentes raças leiteiras (Holandesa, Gir, Jersey, Pardo-Suiça, Girolando entre outros) e diferentes regiões geográficas. Este trabalho objetivou investigar os elementos químicos tóxicos e essenciais à nutrição humana, atuando também como possíveis discriminantes de raça, região e sistema de produção.

Concomitantemente ao estudo da matriz alimentar leite, realizou-se análise química exploratória de diversos alimentos destinados ao gado leiteiro bovino, fazendo inferências sobre a potencialidade de danos à saúde do animal e, especialmente, ao homem, consumidor final dos produtos lácteos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O LEITE BOVINO

O leite é um alimento completo, contendo micronutrientes, aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas, carboidratos, lipídios e proteínas de alta qualidade em proporções adequadas para a nutrição humana, bem como elevada concentração de cálcio e substâncias bioativas (MARTINS, 2003b). As altas ingestões de cálcio estão associadas com estrutura óssea forte, baixo risco de fraturas (OWUSU et al., 1997; FESKANICH et al., 1997), redução de asma e osteoporose em adultos (WIJGA et al., 2003; KARMAUS et al., 2004).

Devido às propriedades nutricionais do leite, a *Food and Agriculture Organization* (FAO) indica o setor lácteo como estratégico para reduzir a fome no mundo, sendo um dos principais agronegócios do Brasil.

De um modo geral, o setor lácteo brasileiro possui particularidades. Há grandes diferenças entre os sistemas de produção, incluindo pastagens de forma extensiva até confinamento total. Os principais produtores estão distribuídos em diversos estados. Cerca de 50 % da produção de leite brasileiro vem de fazendas com menos de 200 L de leite por dia, o que representa até 90 % da produção total de leite. Há alta diversificação de raças européias e indianas, incluindo suas miscigenações. Pequeno número de empresas nacionais e internacionais processam mais da metade do leite produzido no Brasil.

Através do levantamento realizado em 2008 com os 100 maiores produtores brasileiros, realizado pelo site MilkPoint (MILKPOINT, 2009), observa-se que:

- 🐄 Como sistema de produção, o confinamento total dos animais é utilizado por 44 % dos produtores. O semi-confinamento aparece na sequência, com 42 %. O sistema de produção baseado em pastagens foi empregado em 14% das propriedades;
- 🐄 A média de produção de leite dos animais mantidos em confinamento total, semi-confinamento e sistemas de pastagens foi de 29,30 kg/dia, 21,80 kg/dia e 19,30 kg/dia, respectivamente;
- 🐄 A principal raça criada continua sendo a Holandesa, com 56,58 %. A raça Girolando e demais raças mestiças aparecem em segundo lugar, com 31,78 %. Também foram citadas as raças puras de origem (PO) Jersey (5,42 %), Gir (2,32 %) e Pardo-Suíço (3,10 %). Dentre os 100 maiores produtores, 25% utilizam mais de uma raça em sua propriedade;
- 🐄 Minas Gerais continua líder tanto na produção de leite quanto no número de fazendas. Contudo, o número de fazendas diminuiu de 45 % para 42 % em relação ao ano anterior. São Paulo ficou com 11 % e Paraná manteve a segunda posição, com 27 %. Pouco foi alterado nos outros estados;
- 🐄 Da mesma forma como ocorreu no levantamento de 2008, ano base 2007, 45 estabelecimentos comerciais adquiriram o leite das propriedades que participaram do Top100;
- 🐄 A média da produtividade foi de 18.682 litros/ha/ano, variando de 791 a 52.097 litros/ha/ano;
- 🐄 A média geral de produção de leite por animal foi de 24,8 kg/vaca/dia, variando entre 10 a 39 kg/vaca/dia, revelando os sistemas de produção adotados. A região de Ponta Grossa no Paraná destacou-se por concentrar os melhores resultados, obtendo 11 das 12 melhores médias.

De acordo com Teodoro (2006), raças européias como a Holandesa, Jersey e Parda Suíça são especializadas na produção de leite. Se receberem manejo adequado, também podem apresentar alta produção de leite no Brasil. As raças zebuínas como a Gir e Guzerá produzem menos, contudo, são mais resistentes e adaptáveis às condições de manejo. Assim sendo, a utilização de animais com “meio-sangue” europeu x zebu ( $F_1$ ) torna-se uma alternativa viável para produtores que não têm condições de prover manejo de uma raça pura especializada.

Partindo do cruzamento de um animal puro de origem (PO) europeu (Holandesa, Pardo-Suíça, Jersey, etc.), com outro animal zebuíno (Gir, Guzerá, Indubrasil, Sindi ou Nelore), Barbosa et al. (2002) exemplificaram como se obtém um animal puro por cruza (PC). Ao se cruzar uma vaca  $F_1$  com um touro Holandês PO, obtém-se o Holandês-Zebu 3/4. Cruzando-se a fêmea Holandês-Zebu 3/4 com touro Holandês PO, obtém-se o Holandês-Zebu 7/8. Cruzando-se a fêmea Holandês-Zebu 7/8 com touro Holandês PO, obtém-se o Holandês-Zebu 15/16. Se continuar cruzando as fêmeas mestiças com touro Holandês PO, o grau de sangue do bezerro descendente vai sendo apurado, até obter-se um animal puro por cruza (PC), como pode ser observado na Figura 2.1.

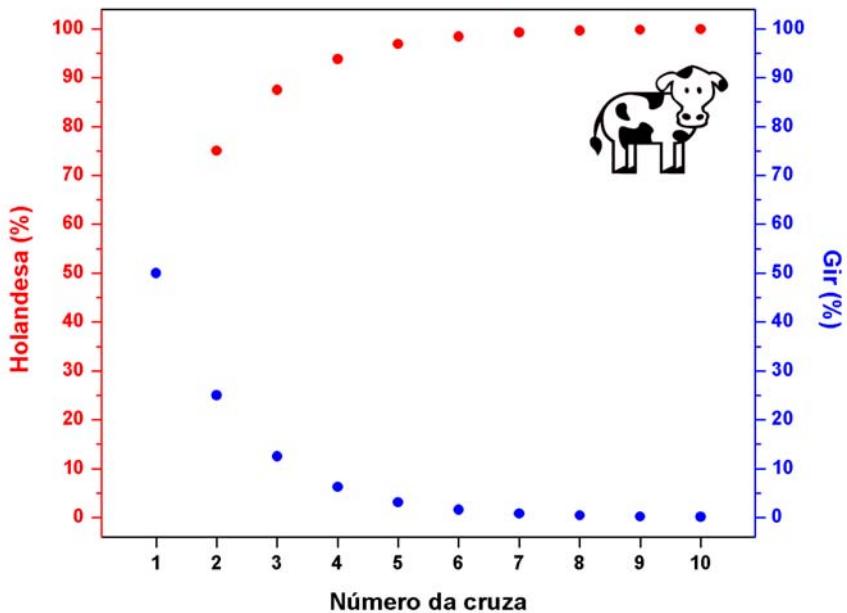


Figura 2.1 Graus de sangue de bezerros oriundos de cruza de uma vaca mestiça com um touro Holandês PO

## 2.2 A INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 51

A Instrução Normativa nº 51 - IN51, pertencente ao Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNMQL), de 18 de setembro de 2002, sancionada pelo então Ministro da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Marcus Vinicius Pratini de Moraes, aprovou os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte (MARTINS, 2003a). A IN51 é reflexo de uma sociedade que segue a tendência mundial cada vez mais preocupada com a qualidade dos produtos que consome. Essa medida, que entrou em vigor em 1º de julho de 2005, tornou compulsória a análise da qualidade do leite tanto para indústrias quanto para pecuaristas.

Segundo o Anexo IV da IN51 (BRASIL, 2002), o leite cru refrigerado deve ter como requisitos físicos e químicos:



- Matéria gorda (g/100g) – mínimo de 3,0
- Densidade relativa a 15/15 °C (g/mL) – 1,028 a 1,034
- Acidez titulável (g ácido láctico/100mL) – 0,14 a 0,18
- Extrato seco desengordurado (g/100g) – mínimo de 8,4
- Índice crioscópico máximo – -0,512 °C
- Proteínas (g/100g) – mínimo de 2,9

Na Tabela 2.1, estão compilados os limites máximos estabelecidos para contagem bacteriana total (CBT) e contagem de células somáticas (CCS). Tanto na propriedade rural como nos tanques comunitários, a temperatura do leite não deve ultrapassar 7 °C, ao passo que no estabelecimento processador, não deve ultrapassar 10 °C.

Tabela 2.1 - Limites máximos estabelecidos para contagem bacteriana total (CBT) e contagem de células somáticas (CCS)

<b>Para as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste</b>				
<b>Período</b>	Até 01/07/2005	01/07/2005 a 01/07/2008	01/07/2008 a 01/07/2011	A partir de 01/07/2011
<b>CBT</b> ( $\times 10^3$ UFC/mL)	1000	1000	750	100* 300**
<b>CCS</b> ( $\times 10^3$ células/mL)	1000	1000	750	400
<b>Para as regiões: Norte e Nordeste</b>				
<b>Período</b>	Até 01/07/2007	01/07/2007 a 01/07/2010	01/07/2010 a 01/07/2012	A partir de 01/07/2012
<b>CBT</b> ( $\times 10^3$ UFC/mL)	1000	1000	750	100* 300**
<b>CCS</b> ( $\times 10^3$ células/mL)	1000	1000	750	400

[CBT] - unidades formadoras de colônia por mL

\* individual

\*\* leite de conjunto

### 2.3 ELEMENTOS QUÍMICOS TÓXICOS E ESSENCIAIS EM LEITE

Progressos tecnológicos, atividades industriais, exploração de minérios e intensificação de tráfego nas rodovias têm aumentado significativamente a contaminação do ambiente. Atividades agrícolas, como o uso de fertilizantes e agroquímicos, práticas de irrigação e manejo, constituem séria fonte de contaminação do ambiente e de produtos alimentares consumidos pelo homem. Como excreção da glândula mamária, o leite pode conter substâncias xenobióticas (pesticidas, desinfetantes, drogas, metais e contaminantes ambientais) em abundância que resultam em riscos tecnológicos para os produtos lácteos derivados e, sobretudo, para a saúde humana. Por essa razão, a avaliação de concentrações residuais de metais em leite pode ser indicador direto do estado higiênico do leite e/ou seus produtos, bem como indicador indireto do grau de poluição do ambiente em que o leite foi produzido (LICATA et al., 2004). A qualidade de produtos alimentares tornou-se, ultimamente, o principal interesse de legisladores e produtores da União Européia (EU) em vista da proteção dos consumidores. Nesse escopo, o controle da origem e da qualidade do alimento demanda o desenvolvimento de métodos analíticos para respaldar a regulamentação. Essa ação é verídica para todas as categorias de alimentos e, particularmente, para produtos lácteos. Produtos de leite bovino são de particular interesse devido à importância social e econômica do mercado de produtos lácteos. Todavia, o risco de manipulação fraudulenta é superior nessa área, por exemplo, substituição de leite em pó por soro é interessante sob o ponto de vista econômico. Torna-se primordial haver métodos analíticos apropriados para a determinação de todos os componentes do leite. A detecção da potencial manipulação requer, então, exata

caracterização analítica de cada tipo de leite bovino para evitar que a avaliação do produto seja totalmente dependente da declaração feita pelo produtor (BORDIN et al., 2001).

A Instrução Normativa 51 também relata que contaminantes orgânicos e inorgânicos eventualmente presentes no leite não devem superar os limites máximos estabelecidos pela legislação específica (ANVISA, 1965,1998), conforme descrito na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 - Limites máximos de tolerância (LMT) para presença de metais em leite\*, de acordo com a legislação brasileira

Metal	LMT (ppm)	Legislação
Antimônio (Sb)	2,00	Decreto nº 55.871, de 26 de março de 1965
Arsênio (As)	0,1	Portaria nº 685, de 27 de agosto de 1998
Cádmio (Cd)	1,00	Decreto nº 55.871, de 26 de março de 1965
Chumbo (Pb)	0,05	Portaria nº 685, de 27 de agosto de 1998
Cobre (Cu)	30	Decreto nº 55.871, de 26 de março de 1965
Cromo (Cr)	0,10	Decreto nº 55.871, de 26 de março de 1965
Estanho (Sn)	250	Decreto nº 55.871, de 26 de março de 1965
Mercúrio (Hg)	0,01	Decreto nº 55.871, de 26 de março de 1965
Níquel (Ni)	5,00	Decreto nº 55.871, de 26 de março de 1965
Selênio (Se)	0,05	Decreto nº 55.871, de 26 de março de 1965
Zinco (Zn)	50	Decreto nº 55.871, de 26 de março de 1965

\*Exceto arsênio e chumbo, que têm valor específico para leite, os demais valores apresentados enquadram o leite na categoria de “outros alimentos”.

A FAO/IAEA Training and Pesticide Center (FAO/IAEA, 1998) também estabeleceu níveis para alguns metais tóxicos que devem ser observados em alimentos (Tabela 2.3).

Tabela 2.3 - Principais metais tóxicos para serem considerados em alimentos e suas faixas de concentração relevantes segundo a FAO/IAEA Training and Pesticide Center

Elemento	Faixa de monitoração (mg/kg)	Níveis máximos (mg/kg)
Arsênio	0,03 – 0,3	0,5
Cádmio	0,001 – 0,1	0,5
Chumbo	0,01 – 0,1	2
Cobre	0,02 - 1	2 <sup>b</sup>
Ferro		c
Mercúrio	0,0005 – 0,005	0,1 <sup>a</sup>
Níquel	0,03 – 3	
Selênio	0,3 – 1	

<sup>a</sup> 1 mg/kg como metilmercúrio em peixe; <sup>b</sup> 5 mg/kg em soro de leite em pó; <sup>c</sup> até 50 mg/kg em soro de leite em pó

A literatura especializada no setor leiteiro é bastante rica, especialmente abordando aspectos do setor produtivo. Dada a importância do leite e produtos lácteos para a nutrição humana, diversos trabalhos catalogaram mais de 30 elementos químicos (Ag, Al, As, Au, Ba, Br, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, I, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, Pt, Rb, Sc, Se, Sr, Ti, V e Zn) determinados em leite in natura, leite em pó, soro de leite e fórmulas infantis, fazendo-se uso de várias metodologias analíticas, em diversas partes do mundo.

A importância do Fe e Cu para o crescimento e o desenvolvimento do corpo humano é muito difundida. O leite de vaca apresenta baixa concentração de Fe e Cu, o que leva à fortificação de fórmulas infantis com diferentes concentrações desses elementos. Este fato gera a necessidade de determinação rotineira dessas espécies químicas em leites (LIMA; DELERUE-MATOS; VAZ, 1998).

Fórmulas infantis requerem rigoroso controle regulador, com especificações dos minerais presentes, para cumprimento da Norma Brasileira para

Comercialização de Alimentos para Lactentes, assim como do Código Internacional para Comercialização de Substitutos do Leite Materno, da Organização Mundial da Saúde. Desta maneira, a determinação da composição elementar das fórmulas infantis vem justificar a importância da exatidão e precisão conseguidas com métodos de elevado rigor metrológico. O leite humano, única fonte de nutrientes durante os primeiros meses de vida da criança, contém todos os nutrientes necessários nas concentrações requeridas. Um fato particularmente importante para certos elementos, como Se e Zn, é que não são armazenados pelo feto enquanto ele cresce no útero. Em fórmulas de leite, elementos essenciais têm sido usualmente adicionados para satisfazer as necessidades nutricionais do lactente. Porém, a adição excessiva desses elementos pode ser danosa para a saúde humana. O leite também pode constituir uma fonte de exposição para elementos tóxicos, especialmente perigosos para crianças. O tempo de lactação é o fator mais importante que determina as concentrações de elementos traços no leite (AKANLE et al., 2001).

O selênio atua na prevenção e no tratamento de doenças degenerativas como câncer, inflamações, doenças cardiovasculares e distúrbios mentais. A determinação de Se em fluidos biológicos como o leite humano ou em alimentos como fórmulas infantis requer técnica de alta sensibilidade devido à baixa concentração. Arsênio, considerado elemento tóxico desde a antiguidade e contaminante inevitável para a existência humana, está presente em quantidade traço, porém invariavelmente na maioria dos alimentos, água potável e atmosfera. Contudo, o arsênio também foi descrito como um elemento ultra-traço essencial para o crescimento humano (ULMAN et al. 1998).

Chumbo e cádmio estão entre os metais presentes no ambiente que têm os maiores efeitos tóxicos. Chumbo tem sido relacionado com deficiências de aprendizado em crianças e cádmio associado a doenças renais. As concentrações de Cd e Pb em leite consideradas contaminantes dependem da região geográfica e de influências ambientais (RODRÍGUEZ; URETRA; ROMERO, 1999). Esses metais não possuem funções biológicas e são transferidos para o leite da mãe por meio de poluentes. O leite materno pode constituir um caminho de ingestão de Pb e Cd por crianças cujas mães tenham sido expostas a esses metais. Comparativamente aos adultos, crianças consomem quantidades significativamente maiores de metais por unidade de peso corpóreo, particularmente em áreas industriais. Leite e fórmulas infantis são frequentemente a única fonte de alimentos para crianças. Dado o impacto evidente de certos elementos químicos em crianças, e considerando que a absorção é significativamente maior do que em adultos, o estabelecimento de valores de referência confiáveis é vital para alcançar ou manter uma nutrição infantil adequada (HALLÉN et al., 1995).

Assim sendo, o interesse na determinação de elementos químicos tóxicos e essenciais com propósitos nutricionais é crescente.

A espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado com duplo foco (DF)ICP-MS foi empregada para determinar Al, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Se, Sr e Zn em amostras de leite em pó desnatado certificado, soro de leite humano, soro de leite de vaca e fórmulas infantis (MARTINO; SANCHÉS; MEDEL, 2000) e de leite integral, leite desnatado e soro de leite (MARTINO; SANCHÉS; MEDEL, 2001). Usando a cromatografia líquida de alta performance com espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (HPLC-ICP-MS),

Martino, Sanchés e Medel (2002) determinaram Br, Ca, Cu, I, Fe, Mg, Mn, Sr e Zn em diversos tipos de soro de leite (humano e bovino) e fórmulas infantis.

Nóbrega et al. (1997) determinaram Ca, K, Mg, Na, P e Zn por espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-AES) e Al, Ba, Cu, I, Mn, Mo, Pb, Rb, Se, Sr e Zn por espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) em amostras de leite em pó, desnatado e integral. A espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) permitiu determinar Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn em leite em pó, fórmulas infantis e leite líquido (McKINSTRY; INDYK; KIM, 1999) e Ca, Fe, Mg e Zn em leite de vaca (SILVA et al., 2001).

Prohaska et al. (2000) determinaram Ag, Al, As, Au, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Pt, Sc, Ti e V em leite humano e fórmulas infantis empregando a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado com campo setorizado (ICP-SFMS). Técnicas analíticas de eletrodo de gota pendente de mercúrio (HMDE), voltametria de redissolução catódica de pulso diferencial (DPCSV) e voltametria de redissolução anódica de pulso diferencial (DPASV) permitiram a quantificação de Hg e Se em amostras de leite da Turquia (İNAM; SOMER, 2000).

Roig et al. (1999) utilizaram espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) para determinar Ca em leite humano, leite de vaca, leite de soja e fórmulas infantis. Alaejos e Romero (1995) utilizaram diversos métodos, inclusive a análise por ativação neutrônica instrumental (INAA), para determinar Se em leite humano e leite comercial. Os autores posicionam a INAA entre as técnicas mais utilizadas para determinar Se em amostras de leite, juntamente com espectrofluorimetria (SPF) e espectrometria de absorção atômica (AAS).

## 2.4 ANÁLISE POR ATIVAÇÃO NEUTRÔNICA INSTRUMENTAL

A análise por ativação consiste na utilização de reações nucleares para produção de radionuclídeos ou estados excitados de elementos químicos que se deseja quantificar. O bombardeamento pode ser feito com nêutrons, como na Equação 1, partículas carregadas ou fótons. Dependendo da existência ou não de tratamentos químicos, a técnica pode ser dividida em três categorias, como se observa na Figura 2.2. Não havendo qualquer tratamento químico é chamada análise por ativação neutrônica instrumental (INAA - *instrumental neutron activation analysis*). Se ocorrer tratamento químico antes da irradiação, tem-se análise por ativação neutrônica química (CNAA - *chemical neutron activation analysis*). Se o tratamento for após a irradiação, tem-se análise por ativação neutrônica radioquímica (RNAA - *radiochemical neutron activation analysis*) (EHMANN; VANCE, 1991). Vale mencionar que a NAA também pode ser classificada de acordo com a energia dos nêutrons utilizados (ALFASSI, 1994a).

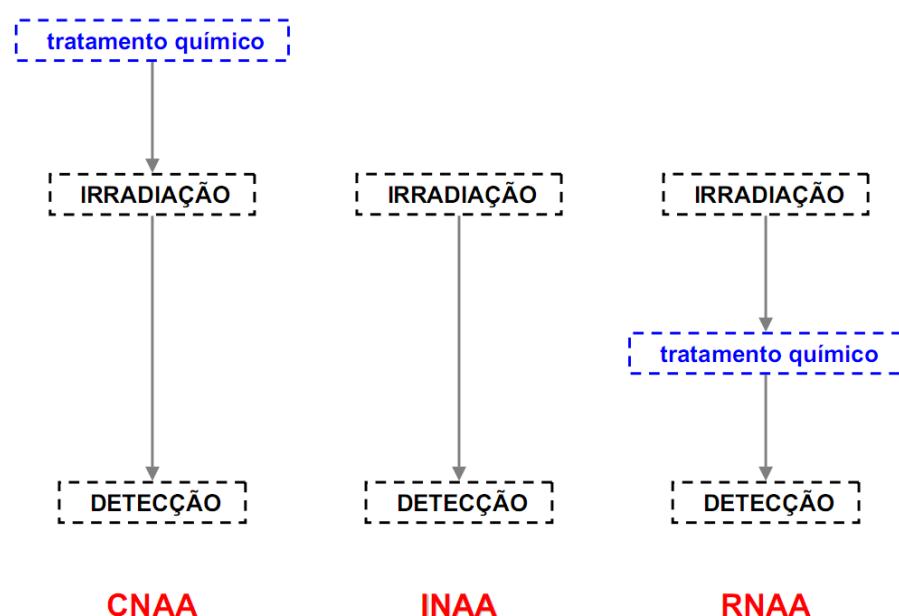


Figura 2.2 Classificação da análise por ativação neutrônica quanto ao tratamento químico dispensado às amostras antes ou depois da irradiação

Os elementos químicos passíveis de mensuração pela INAA podem ser visualizados na Figura 2.3.

1	H																			2	He
3		4																			
Li		Be																			
11		12																			
Na		Mg																			
19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36				
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr				
37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54				
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe				
55	56	57	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86				
Cs	Ba	<sup>1</sup> La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn				
87	88	89	104	105																	
Fr	Ra	<sup>2</sup> Ac	Rf	Db																	
<sup>1</sup> Lantanídeos			58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71					
<sup>2</sup> Actinídeos			Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu					
			Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lr					
			<p><b>Isótopos estáveis</b>  <b>Radioisótopos que podem ser produzidos. Limitação é a meia-vida ou fluxo de energia</b>  <b>Elementos rotineiramente determinados por INAA</b></p>																		

Figura 2.3 Os elementos químicos passíveis de mensuração pela INAA

SERC - Carleton College. Instrumental Neutron Activation Analysis (INAA)  
Disponível em: [http://serc.carleton.edu/images/research\\_education/geochemsheets/techniques/periodic\\_table\\_inaa.jpg](http://serc.carleton.edu/images/research_education/geochemsheets/techniques/periodic_table_inaa.jpg)  
Acesso em: 30 mai. 2009

A quantificação química em NAA pode ser realizada de diversas formas. Pode-se fazer uso da equação fundamental, método conhecido como paramétrico ou absoluto (PARRY, 1991), porém pouco utilizado, dado à dificuldade da determinação exata de todos os parâmetros nucleares envolvidos. Existe também o método comparativo (Equação 1), em que se irradiam padrões conjuntamente com as amostras para todos os elementos de interesse (EHMANN; VANCE, 1991).

$$\frac{R_{std}}{R_{sam}} = \frac{W_{std}(e^{-\lambda T})_{std}}{W_{sam}(e^{-\lambda T})_{sam}} \quad (1)$$

onde:

$\lambda$  = constante de decaimento

$R$  = taxa de contagem

$W$  = massa do elemento

$T$  = tempo de decaimento

$std$  = índice que representa o padrão

$sam$  = índice que representa a amostra

Desde o seu surgimento, o método  $k_0$  (Equação 2) vem sendo utilizado pela vantagem de eliminar problemas relacionados com preparo, manutenção e análise de diversos padrões para vários elementos químicos. Assim sendo, o custo da análise e a quantidade de operações laboratoriais diminuem (DE CORTE et al., 1987; DE CORTE, 2001; INGELBRECHT et al., 1991; KUČERA et al., 1999).

$$\rho_a = \frac{\left(\frac{N}{WtSDC}\right)_a}{A_{Au}} \frac{I}{k_{0,Au}(a)} \left( \frac{f + Q_{0,Au}(\alpha)}{f + Q_{0,a}(\alpha)} \right) \frac{\varepsilon_{Au}}{\varepsilon_a} \quad (2)$$

onde:

$\rho$  = fração de massa de um elemento

$a$  = índice que representa o analito

$Au$  = índice que representa o comparador (ouro)

$N$  = área do fotópico de interesse

$W$  = massa da amostra

$T$  = tempo de medição da amostra

$S$  = fator de saturação

$D$  = fator de correção de decaimento radioativo para tempo zero

$C$  = fator de correção de decaimento durante a contagem

$A$  = taxa de contagem específica

$\varepsilon$  = eficiência de detecção para o fotópico

$f$  = razão entre fluxos térmico e epitérmico

$Q_0$  = integral de ressonância

$\alpha$  = parâmetro de distribuição de energia dos nêutrons epitérmicos

Porém, a determinação de baixos níveis de radiação pode ser prejudicada pela complexidade do espectro de radiação gama, por interferências provenientes da radiação *Bremsstrahlung* da desintegração beta ou por espalhamento Compton (LANDSBERGER, 1994). O contínuo Compton surge principalmente pela deposição incompleta da energia dos fótons incidentes nos detectores, sendo geralmente produzidos pela emissão de fótons de alta energia, como  $^{28}\text{Al}$ ,  $^{49}\text{Ca}$ ,  $^{38}\text{Cl}$ ,  $^{56}\text{Mn}$ ,  $^{24}\text{Na}$ ,  $^{42}\text{K}$  e  $^{65}\text{Zn}$ , que, na maioria das vezes, representam a principal atividade de amostras de matrizes biológicas (MAUERHOFER, 1996). O sistema de supressão Compton (CSS) surge como alternativa para minimizar o problema do contínuo Compton.

A supressão Compton aliada à irradiação de nêutrons epitérmicos foram fatores imprescindíveis na melhoria das condições para a determinação de As, Cd e Sb (LANDSBERGER; LARSON; WU, 1993; LANDSBERGER; WU, 1999), com a utilização de nêutrons térmicos e epitérmicos conjuntamente com supressão Compton, conseguiram melhorar as condições para determinação de As, Cd, Hg e Sb, pela diminuição das interferências de Br, Cl e Na. Yonezawa, Matsue e Yukawa (2003) expuseram resultados de cinco materiais de referência certificados, destacando que com a utilização de um sistema de supressão Compton, houve redução da interferência de  $^{24}\text{Na}$  e  $^{38}\text{Cl}$  na determinação de  $^{128}\text{I}$  em 3,7 e 4,6 vezes, respectivamente. Santos (2004) utilizou as razões dos limites de detecção com e sem supressão Compton em amostras de grão de arroz, ervilha, feijão, grão-de-bico, lentilha e batata para demonstrar a capacidade analítica do equipamento, contudo constatou-se que o ganho real para As, Ca, Cd, Cr, Fe, Hg, K, Rb e Zn dependem fortemente do material analisado.

## 2.5 ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO

Segundo Sato e Kawashita (2002), os espectrômetros de massas são constituídos basicamente pela fonte de íons, analisador de massas e sistemas de detecção. Em virtude da necessidade de acelerar a massa no analisador, torna-se primordial a ionização da amostra. Para tal existem várias técnicas, como termo-ionização, plasma, impacto de elétrons e impacto de íons. Entre elas, o plasma produz com maior eficiência os feixes de íons.

Na espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), o sistema de introdução de amostra é crítico, visto que somente 1 – 2% da amostra atingem o plasma. Este sistema tem como função gerar um aerossol com o auxílio de um nebulizador e uma câmara de pulverização (THOMAS, 2001a). Quando as gotículas de aerossol entram no plasma, rapidamente tornam-se sólidas. Após o processo de vaporização, tornam-se gasosas. Sequencialmente, o gás é atomizado e ionizado (THOMAS, 2001b). Esse processo está esquematizado na Figura 2.4.

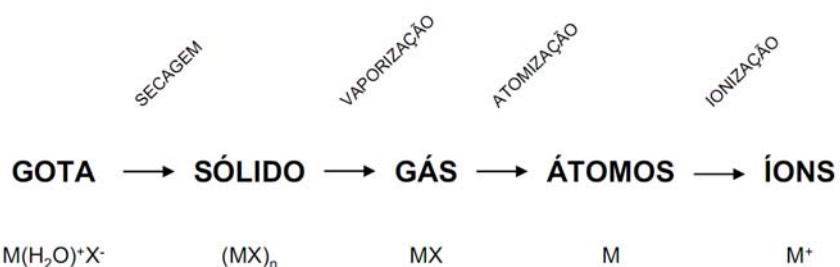


Figura 2.4 Esquema de ionização de amostras realizado pelo plasma

A região de interface é responsável por transportar os íons eficientemente, consistentemente e com a integridade elétrica gerada pelo plasma à região de análise do espectrômetro de massas. Na região de interface há 2 cones metálicos

com orifícios bem pequenos. Essa região é mantida à pressão de aproximadamente 2 Torr com auxílio de uma bomba mecânica (THOMAS, 2001c).

Sequencialmente à região de interface, há o sistema de focalização iônica. Sua função é possibilitar que os feixes de íons oriundos de ambiente hostil do plasma atinjam o analisador de massas de forma colimada (THOMAS, 2001d).

O analisador de massas, mantido à pressão de aproximadamente  $10^{-6}$  Torr é responsável pela separação dos íons pela relação massa/carga. O sistema analisador de massa mais comum é o tipo quadrupolo, constituído basicamente por dois pares de cilindros paralelos submetidos a uma diferença de potencial e operado a uma frequência de 2 – 3 MHz (THOMAS, 2001e). Segundo Giné-Rosias (1999), variando-se a diferença de potencial aplicada no quadrupolo, é possível realizar com tempo inferior a 20 ms ( $t < 20\text{ms}$ ) uma varredura entre 6 – 238 unidades de massa atômica (u.m.a.), com discriminação de 1 u.m.a.

Basicamente, após os íons saírem do analisador de massas, eles são atraídos para dinodos recobertos com material emissor de elétrons. Os elétrons são multiplicados e há geração de um pulso, que por sua vez é amplificado e discriminado (THOMAS, 2001f).

## **2.6 CONFIABILIDADE METROLÓGICA**

De acordo com o “*International Vocabulary of Metrology: Basic and general concepts and associated terms*”, a Metrologia pode ser definida como a ciência que estuda as medições e suas aplicações, incluindo todos os aspectos teóricos e práticos (BIPM, 2008; INMETRO, 2007b).

Historicamente, ela tem aproximadamente 5000 anos. A importância das medições para a humanidade vem desde a Idade Antiga. Em 3000 a.C., no Egito, quando as pirâmides foram construídas, estabeleceu-se o primeiro padrão de comprimento de que se tem conhecimento. A medida do padrão (cúbito) foi entalhada em um artefato constituído de granito preto, que era mantido sob responsabilidade dos arquitetos. Para os trabalhadores de campo, foram entregues réplicas desse padrão.

As unidades de medições foram padronizadas na Inglaterra já no século XIII, entretanto, variações e abusos continuaram por muito tempo. Citam-se, como exemplo, as três medidas para o “galão”, cuja padronização ocorreu em 1824. Nos Estados Unidos, apesar de algumas diferenças, o primeiro sistema de medidas adotado foi o Inglês. Na metade do século XX, ainda havia diferenças em medidas que nominalmente eram as mesmas. A polegada inglesa media 2,53998 cm enquanto a polegada americana media 2,540005 cm. Ambas foram padronizadas em 2,54 cm em julho de 1959 (DICTIONARY OF MEASURES, UNITS AND CONVERSIONS, 2003a).

A criação do Sistema Métrico Decimal sucedeu-se oficialmente em 22 de junho de 1799 durante a Revolução Francesa, tendo como intenção declarada de ser “para todas as pessoas, para todo o tempo”. Na ocasião, dois padrões de platina foram criados para representar o metro e o quilograma. Esses fatos podem ser considerados como os precursores do Sistema Internacional de Unidades atual (INMETRO, 2007a). Nos anos que se sucederam, concentraram-se esforços para encontrar padrões absolutos baseados em fenômenos físicos observáveis (DICTIONARY OF MEASURES, UNITS AND CONVERSIONS, 2003a).

Inicialmente, foram adotadas pelo Sistema Métrico Decimal três unidades básicas de medida: o metro, o litro e o quilograma. Com o passar dos anos e o desenvolvimento científico e tecnológico, necessitou-se cada vez mais de medições precisas. Em 1960, substituiu-se o Sistema Métrico Decimal pelo Sistema Internacional de Unidades (SI), mais complexo e sofisticado. Em 1962, o SI também foi adotado pelo Brasil, sendo ratificado pela Resolução nº 12 de 1988 do Conselho Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial – Conmetro, tornando-se compulsória sua utilização em todo o Território Nacional (INMETRO, 2009).

O símbolo e as unidades de base do SI são: metro (m) – unidade básica de comprimento; quilograma (kg) – unidade básica de massa; segundo (s) – unidade básica de tempo; ampere (A) – unidade básica de corrente elétrica; kelvin (K) – unidade básica de temperatura; mol (mol) – unidade básica da quantidade de matéria e candela (cd) – unidade básica de intensidade luminosa (DICTIONARY OF MEASURES, UNITS AND CONVERSIONS, 2003b; INMETRO, 2007a). Destaca-se que todas as unidades derivadas são expressas em função das unidades de base.

Especificamente no âmbito da metrologia em química, criou-se em 1993 o *Consultative Committee for Amount of Substance: Metrology in Chemistry* – CCQM. Resumidamente, esse comitê é responsável pela aplicação dos princípios como incerteza de medição, rastreabilidade e uniformidade internacional de maneira que garanta a confiabilidade dos resultados (RICHTER, 1999).

Estima-se que aproximadamente 50 % de todas as medições realizadas no mundo inteiro correspondam a medições em química (ZSCHUNKE, 2001).

*“A strong international measurement and standards infrastructure is critical to ensuring equity in trade and a high*

*quality of life, and to facilitating global recognition of measurements to promote international trade and the economic growth of a nation. In such a climate measurement disagreements between countries are viewed as an unacceptable barrier to trade. To overcome such problems it is necessary to have an international infrastructure within which it is possible to make comparable measurements. This is true for all types of measurement, including chemical. Such a system requires standards that have long-term stability and are internationally recognized. The international system of units (SI) is such a system, and by the use of traceable measurements provides an international infrastructure for comparable measurements. An international programme for metrology in chemistry is extending this infrastructure to the field of chemical measurements" (WIELGOSZ, 2002).*

Assim sendo, a elaboração de um sistema único de metrologia em química, exige colaboração mútua e intercâmbio de conhecimento entre laboratórios. Entretanto, devido à complexidade dos processos de medições, que muitas vezes envolvem problemas de interferentes, uma análise química confiável não é simples (EAG DG RTD, 2000).

Bode (2005) cita que tanto a pesquisa quanto o desenvolvimento científico requerem confiança no grau de exatidão dos valores dos resultados, na comparabilidade dos resultados e na forma de execução da pesquisa. Sendo assim, pelo fato da Metrologia ser a ciência das medições e suas aplicações, o analista deve compreender os princípios da medição, os instrumentos de análises utilizados,

estar ciente do que pode dar errado e, no caso de alguma eventualidade, saber como proceder para que o problema seja resolvido. Para tal, quem realiza a análise precisa evitar erros, demonstrar que o método funciona adequadamente, ter certeza que os seus resultados são confiáveis, ser capaz de reproduzir o seu trabalho e tornar os seus resultados comparáveis aos dos outros (informação verbal)<sup>1</sup>.

A quantificação química pela análise por ativação neutrônica (NAA), fundamenta-se na relação direta existente entre a quantidade de um determinado elemento químico presente na amostra e a radioatividade gerada a partir dele pelo bombardeamento de nêutrons (EHMANN; VANCE, 1991). Como característica inerente à técnica, ela se autovalida, visto que os elementos químicos são determinados por mais de um radionuclídeo, em diferentes tempos de decaimento e, na maioria das vezes, por mais de um raio-gama. Além disso, quando os elementos químicos são quantificados por mais de um raio-gama, todos os resultados individuais devem ser concordantes uns com os outros.

Em 2000 (BODE; FERNANDES; GREENBERG, 2000) e 2001 (TIAN et al., 2001), a INAA foi proposta como método primário de medição. Em 2007, durante a 13<sup>a</sup> Reunião Anual do *Consultative Committee for Amount of Substance: Metrology in Chemistry* (CCQM), a NAA foi oficialmente reconhecida como método primário de medição, juntamente com gravimetria, coulometria, titulometria, espectrometria de massas por diluição isotópica e depressão do ponto de congelamento (BIPM, 2007). Sistemas metrológicos aceitos internacionalmente incluem requerimentos para comparabilidade, rastreabilidade, exatidão, incerteza e estabilidade ao longo do tempo das medições (BODE; FERNANDES; GREENBERG, 2000). Como um exemplo na Tabela 2.4 estão compiladas as fontes de incertezas atingíveis em

---

<sup>1</sup> Informação fornecida pelo Prof. Dr. Peter Bode na disciplina Metrologia (CEN 5761) em 2005

condições otimizadas para as medições fazendo-se uso da INAA. Esses níveis de incerteza são valores indicativos, obtidos apenas quando atenção extrema é dedicada à execução da análise.

Tabela 2.4 - Fontes de incertezas atingíveis em condições otimizadas para as medições fazendo-se uso da INAA (adaptado de BODE; FERNANDES; GREENBERG, 2000)

Fonte de erro	$1\sigma$ , %
Preparação da amostra	
Determinação da massa – amostra	0,003
Determinação da massa – padrão	0,011
Concentração do padrão	0,03
Variabilidade isotópica	desprezível*
Correção do branco	0,003
Irradiação	
Diferença de geometria	0,018
Diferença devido a auto-atenuação/espalhamento de nêutrons	0,03
Cronometragem	desprezível*
Interferências da irradiação	0,014
Espectrometria de raios $\gamma$	
Estatística de detecção	0,03
Diferença de geometria de detecção	0,011
Perda por efeito de “empilhamento”	0,003
Efeito de tempo morto	desprezível*
Efeito de tempo de meia-vida	desprezível*
Auto-atenuação de raios $\gamma$	0,014
Interferências de raios $\gamma$	0,014
Integração do fotópico	0,003
<b>Incerteza geral (<math>1\sigma</math>)</b>	<b>0,062</b>

\* Desprezível para o caso geral. Pode ser significativo em alguns casos.

Em 2001, o Laboratório de Radioisótopos obteve reconhecimento junto à *International Atomic Energy Agency* (IAEA) no escopo do projeto ARCALL XXVI, de acordo com os requisitos da NBR ISO/IEC 17025 (ABNT, 2001). Informações detalhadas sobre a implementação do sistema da qualidade, bem como dos resultados obtidos, foram descritas por Fernandes et al. (2006).

A partir das primeiras participações ocorridas em 2001 em exercícios metrológicos e da implementação do sistema da qualidade, o envolvimento do LRI no cenário internacional da metrologia em química se consolidou. São onze atuações em estudos-piloto do CCQM entre 2001 e 2006, a saber:

- ✓ “*Arsenic in shellfish*”, CCQM-P11;
- ✓ “*Cd and Zn in rice*”, CCQM-P29;
- ✓ “*Alloying additions in aluminium alloy*”, CCQM-P34.1;
- ✓ “*As, Hg, Pb, Se and Methylmercury in Tuna Fish*”, CCQM-P39;
- ✓ “*As, Hg, Pb, Se and Methylmercury in Salmon*”, CCQM-P39.1;
- ✓ “*Minor elements in steel*”, CCQM-P56;
- ✓ “*Nonfat soybean powder*”, CCQM-P64;
- ✓ “*Chemical composition of clay*”, CCQM-P65;
- ✓ “*Key metals in fertilizer*”, CCQM-P66;
- ✓ “*Trace elements in sewage sludge*”, CCQM-P70;
- ✓ “*Essential and toxic elements in bovine liver*”, CCQM-P85.

Os bons resultados obtidos nos estudos-pilotos refletem a qualidade analítica do LRI (FERNANDES, 2006).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 AMOSTRAGEM

##### 3.1.1 LEITE COMERCIAL

A primeira atividade da pesquisa foi realizar um amplo levantamento das marcas de leite disponíveis no varejo da cidade de Piracicaba. Foram selecionadas 25 amostras de leites comerciais UHT no varejo, compreendendo diferentes teores de gordura (desnatado, semi-desnatado e integral) e de 5 estados brasileiros (GO, MG, PR, RS e SP). Informações referentes às amostras estão na Tabela 3.1. Tal experimento permitiu investigar a potencialidade da INAA para a quantificação de elementos químicos da matriz alimentar em questão.

##### 3.1.2 REPRESENTATIVIDADE AMOSTRAL

Avaliou-se a representatividade amostral em duas situações distintas, seguindo-se as recomendações estabelecidas pela IDF 50 (ISO/DIS 707) “*Milk and Milk Products – Guidance on Sampling*” (IDF 50, 2004).

A primeira coleta foi realizada em um silo de estocagem com 22000 L (Figura 3.1) na cidade de Arapuá, MG. Nesse experimento, coletaram-se sequencialmente 10 amostras de 1 L cada por uma válvula de escoamento. A segunda coleta foi realizada em um tanque de resfriamento do Centro de Treinamento da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ) da Universidade de São Paulo (USP) em Piracicaba, SP (Figura 3.2). Na ocasião, coletaram-se 16 amostras de 0,25 L da porção superior de um tanque de 1400 L, em 3 posições radiais e em diferentes profundidades. Para tal, fez-se uso de um utensílio desenvolvido no Laboratório de Radioisótopos (LRi) especificamente para esta finalidade (Figura 3.3).

Tabela 3.1 - Quantidade de gordura, local de produção e eventual particularidade de leites comerciais UHT adquiridos no comércio da cidade de Piracicaba para estudo da composição química

Número	Quantidade de gordura	Local	Particularidade
01	desnatado	PR	-
02	desnatado	RS	-
03	desnatado	RS	-
04	desnatado	SP	-
05	desnatado	GO	-
06	desnatado	GO	-
07	desnatado	SP	-
08	desnatado	RS	-
09	desnatado	SP	-
10	semi-desnatado	RS	-
11	semi-desnatado	GO	-
12	integral	PR	-
13	integral	RS	-
14	integral	RS	-
15	integral	RS	-
16	integral	GO	-
17	integral	MG	-
18	integral	SP	-
19	integral	GO	-
20	integral	SP	-
21	desnatado	PR	enriquecido com Ca
22	semi-desnatado	PR	baixa lactose
23	semi-desnatado	RS	enriquecido com Ca
24	semi-desnatado	RS	enriquecido com fibra alimentar
25	integral	PR	enriquecido com Fe



Figura 3.1 Silo de estocagem na propriedade localizada na cidade de Arapuá, MG, onde foi realizada a primeira amostragem



Figura 3.2 Tanque de resfriamento do Centro de Treinamento da ESALQ/USP, em Piracicaba, SP, onde foi realizada a segunda amostragem



Figura 3.3 Utensílio desenvolvido no Laboratório de Radioisótopos (LRi) para coleta de leite de gado bovino em diversas profundidades do tanque de resfriamento do Centro de Treinamento da ESALQ/USP no estudo da representatividade amostral

### 3.1.3 ESTUDO 1: LEITE AMOSTRADO DE TANQUES DE RESFRIAMENTO

Para estudar o leite bovino de importantes regiões produtoras brasileiras, amostrou-se o leite do tanque de resfriamento de 51 propriedades rurais, sendo 32 localizadas em cidades do estado de Minas Gerais (Figura 3.4) e 19 a aproximadamente 1800 km de distância, na cidade de Rio Grande (Figura 3.5), estado do Rio Grande do Sul.

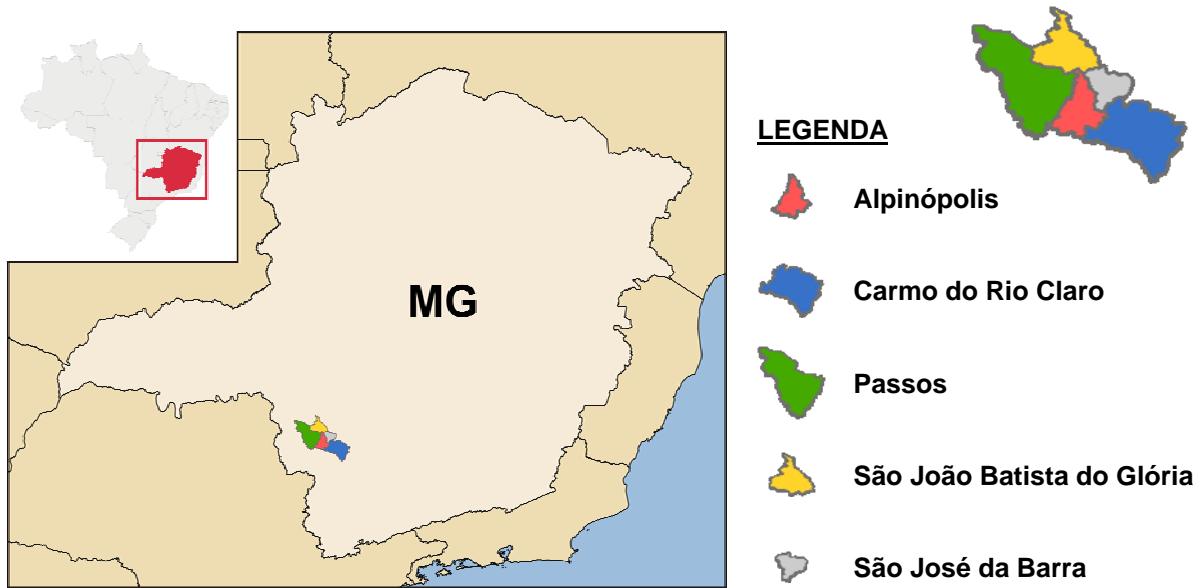


Figura 3.4 Mapa com as cidades do estado de Minas Gerais onde foram realizadas coletas nos tanques de resfriamento de propriedades rurais

As 32 propriedades amostradas no estado de Minas Gerais possuíam características semelhantes. Cada fazenda tinha aproximadamente 30 animais, constituídos predominantemente pela raça Girolando. No geral, os animais eram criados em sistema semi-extensivo e, além do pasto, se alimentavam com silagem de milho e concentrados variando entre 20 % a 27 % de proteína.

Para as coletas, o tanque de resfriamento foi dividido imaginariamente em quatro quadrantes de mesmas dimensões. A coleta propriamente dita foi realizada com movimentos aleatórios em cada um deles, resultando uma amostra de 1 L ( $4 \times 250$  mL). Para tal, fez-se uso do mesmo utensílio (Figura 3.3) utilizado no estudo da representatividade amostral (“3.1.2 Representatividade amostral”).

Do volume total amostrado, 50 mL foram separados para a contagem de células somáticas (CSS) e determinação de gordura, proteína, lactose, sólidos totais, extrato seco desengordurado e nitrogênio uréico. Outros 50 mL foram destinados para a contagem bacteriana total (CBT).

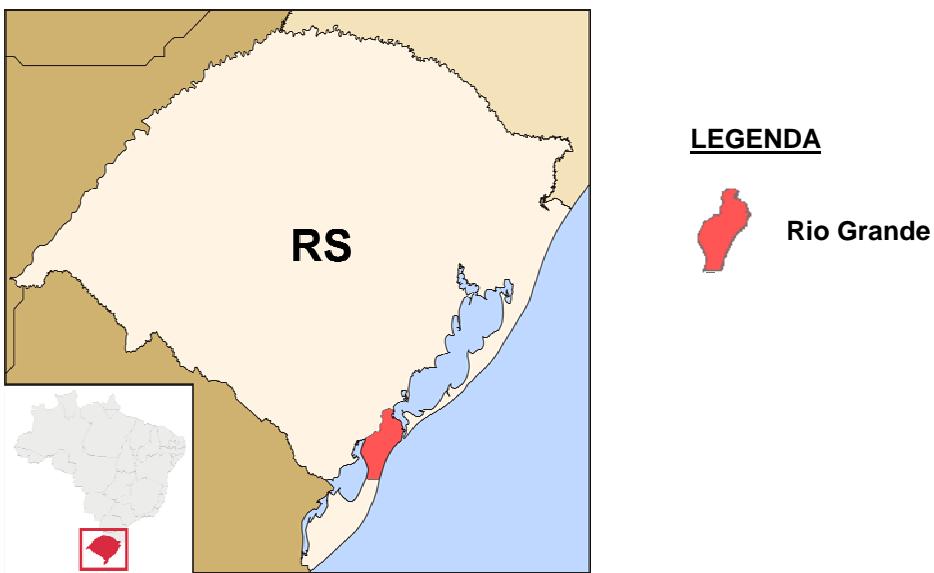


Figura 3.5 Mapa com a cidade do estado do Rio Grande do Sul onde foram realizadas coletas nos tanques de resfriamento de propriedades rurais

As 19 fazendas leiteiras de Rio Grande, RS, também possuíam características semelhantes, entretanto, eram de dimensões menores. As propriedades tinham aproximadamente 10 animais e, em alguns casos, a ordenha era realizada manualmente. Os animais, predominantemente da raça Girolando, também eram criados em sistema semi-extensivo e, além de pasto, se alimentavam com silagem de milho, casca de arroz, casca de soja e concentrados variando entre 16 % a 20 % de proteína. A amostragem foi semelhante à realizada nas fazendas leiteiras do estado de Minas Gerais, entretanto, devido às dificuldades de conservação e transporte, realizou-se uma subamostragem no próprio local da coleta. Após a coleta de 1 L, os vasilhames foram agitados por 1 minuto e 250 mL de seu conteúdo foram transferidos para outro recipiente de menor volume.

Em virtude do tempo de permanência no estado do Rio Grande do Sul, não coletaram-se alíquotas para análises referentes à Instrução Normativa 51. Segundo os procedimentos de amostragem estabelecidos pela Clínica do Leite, da ESALQ/USP, para que os resultados obtidos possam ser considerados válidos, o intervalo permitido entre coleta e análise não pode ser superior a 7 dias.

### 3.1.4 ESTUDO 2: LEITE AMOSTRADO DE ANIMAIS

Para o estudo de leite oriundo de animais, realizaram-se 4 coletas em propriedades distintas no estado de São Paulo. Duas delas foram realizadas na cidade de Piracicaba (propriedade “A” e propriedade “B”), outra na cidade de Mococa (propriedade “C”) e a última na cidade de Araras (propriedade “D”). O mapa com a localização das 3 cidades pode ser visualizado na Figura 3.6.

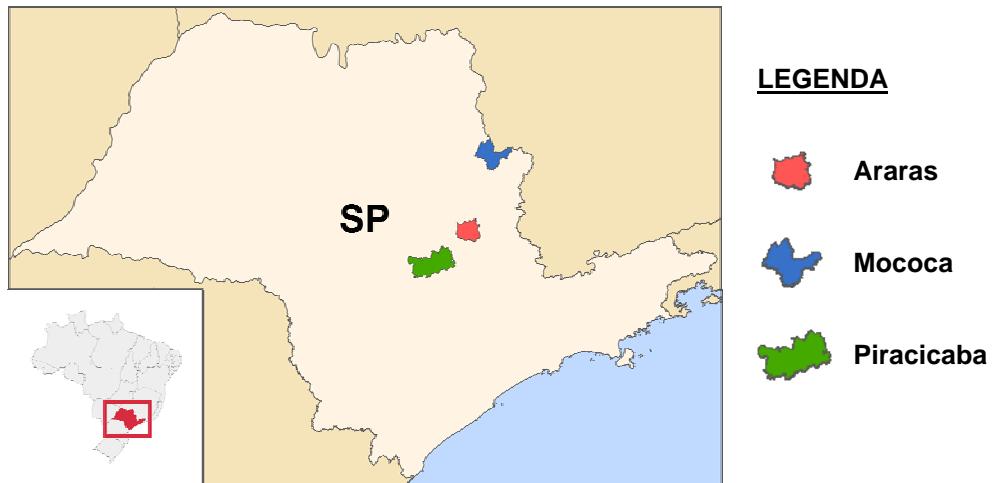


Figura 3.6 Mapa com as cidades do estado de São Paulo onde foram realizadas coletas diretamente nos animais

A primeira coleta foi realizada em uma propriedade rural de economia familiar (propriedade “A”). Nela, há aproximadamente 40 animais de diferentes raças e idades, entretanto, no período da coleta, 30 animais estavam em lactação (Figura 3.7). Entre os animais da propriedade “A”, há aproximadamente 50 % de genética Holandesa, 40 % de genética Gir e 10 % de genética Jersey, distribuídas em animais puros e mestiços.



Figura 3.7 Propriedade rural de economia familiar situada no município de Piracicaba, SP, onde foi coletado o leite de 30 animais em lactação

De cada animal, ordenharam-se manualmente cerca de 250 mL de leite. Do volume total amostrado:

- ✓ 50 mL foram separados para a contagem de células somáticas (CSS) e determinação da gordura, proteína, lactose, sólidos totais, extrato seco desengordurado e nitrogênio uréico
- ✓ 50 mL para a contagem bacteriana total (CBT)
- ✓ 150 mL foram destinados às determinações dos elementos químicos

Informações referentes às características dos 30 animais amostrados, como raça, número de partos e dias aproximados de lactação estão na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Características dos 30 animais amostrados em uma propriedade rural de economia familiar situada no município de Piracicaba, SP

Número	Raça	Número de partos	Dias em lactação
1	H	4	180
2	1/2 G + 1/2 H	6	90
3	1/2 G + 1/2 H	4	210
4	H	7	30
5	J	2	90
6	1/2 G + 1/2 H	5	120
7	1/2 G + 1/2 H	3	90
8	1/2 G + 1/2 H	4	30
9	1/4 G + 3/4 H	6	40
10	1/2 G + 1/2 H	2	40
11	1/2 G + 1/2 H	4	60
12	1/4 G + 3/4 H	4	150
13	H	3	270
14	1/4 G + 3/4 H	7	120
15	1/2 G + 1/2 H	1	60
16	1/2 G + 1/2 H	6	150
17	1/4 G + 3/4 H	3	90
18	1/2 H + 1/2 J	4	20
19	3/4 G + 1/4 H	5	210
20	H	4	90
21	1/2 G + 1/2 H	4	210
22	1/2 G + 1/2 H	5	120
23	1/4 H + 3/4 J	4	60
24	3/4 G + 1/4 H	5	60
25	1/4 G + 3/4 H	5	150
26	3/4 G + 1/4 H	3	10
27	3/4 G + 1/4 H	2	60
28	3/4 G + 1/4 H	6	120
29	7/8 G + 1/8 H	4	90
30	1/4 H + 3/4 J	4	240

G = Gir; H = Holandesa; J = Jersey

A segunda coleta foi realizada no Centro de Treinamento da ESALQ/USP (Figura 3.8), identificada como propriedade “B”. Para tal, contou-se com a colaboração da aluna de pós-graduação, Sra. Marina de Arruda Camargo Danés, orientada do Prof. Dr. Flávio Augusto Portela Santos, do Departamento de Zootecnia. Na propriedade “B”, há aproximadamente 60 % de genética Holandesa e 40 % de genética Jersey, entre animais puros e mestiços.



Figura 3.8 Centro de Treinamento da ESALQ/USP onde foi coletado o leite de 31 animais em lactação

Na ocasião, 250 mL de leite foram amostrados de 31 animais selecionados de sua pesquisa. A alíquota foi extraída diretamente do compartimento medidor de volume do sistema de ordenha. Do volume total amostrado:

- ✓ 50 mL foram separados para a contagem de células somáticas (CSS) e determinação da gordura, proteína, lactose, sólidos totais, extrato seco desengordurado e nitrogênio uréico
- ✓ 50 mL para a contagem bacteriana total (CBT)
- ✓ 150 mL foram destinados às determinações dos elementos químicos.

Informações referentes às características dos 31 animais amostrados, como raça, número de partos e dias de lactação estão na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 - Características dos 31 animais amostrados do Centro de Treinamento da ESALQ/USP, situado na cidade de Piracicaba, SP

Número	Raça	Número de partos	Dias em lactação
01	J	2	181
02	H	2	221
03	1/2 H + 1/2 J	1	139
04	1/2 H + 1/2 J	1	84
05	1/2 H + 1/2 J	5	260
06	1/2 H + 1/2 J	4	66
07	1/4 H + 3/4 J	2	74
08	1/2 H + 1/2 J	2	140
09	1/2 H + 1/2 J	2	80
10	1/2 H + 1/2 J	1	301
11	H	6	132
12	1/2 H + 1/2 J	4	127
13	1/2 H + 1/2 J	4	138
14	H	6	233
15	1/4 H + 3/4 J	2	82
16	1/2 H + 1/2 J	2	146
17	J	2	101
18	1/2 H + 1/2 J	2	194
19	1/2 H + 1/2 J	1	187
20	1/2 H + 1/2 J	2	119
21	1/2 H + 1/2 J	5	155
22	1/2 H + 1/2 J	3	201
23	H	1	340
24	1/4 H + 3/4 J	1	139
25	H	3	66
26	H	5	210
27	1/2 H + 1/2 J	1	397
28	1/2 H + 1/2 J	1	101
29	1/2 H + 1/2 J	2	294
30	H	6	168
31	H	9	242

H = Holandesa; J = Jersey

A terceira propriedade visitada (propriedade “C”) está localizada no município de Mococa, SP. Nela, há somente animais puros de origem (PO) da raça Gir (Figura 3.9).



Figura 3.9 Propriedade rural localizada no município de Mococa, SP, onde foi amostrado leite de 25 animais puros de origem (PO) da raça Gir

De cada animal, pelo sistema balde ao pé com a presença do bezerro, coletaram-se 250 mL de leite. Do volume total amostrado:

- ✓ 50 mL foram separados para a contagem de células somáticas (CSS) e determinação da gordura, proteína, lactose, sólidos totais, extrato seco desengordurado e nitrogênio uréico
- ✓ 50 mL para a contagem bacteriana total (CBT)
- ✓ 150 mL foram destinados às determinações dos elementos químicos

Informações referentes às características dos 25 animais amostrados, como raça, número de partos e de dias aproximadas de lactação estão na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 - Características dos 25 animais puros de origem (PO) da raça Gir da propriedade rural localizada na cidade de Mococa, SP

Número	Número de partos	Dias em lactação
01	3	227
02	5	179
03	3	298
04	4	130
05	1	67
06	2	60
07	3	13
08	4	180
09	1	161
10	1	206
11	3	106
12	2	372
13	1	78
14	1	134
15	1	78
16	2	185
17	2	188
18	1	216
19	2	197
20	1	234
21	1	126
22	5	102
23	1	224
24	1	126
25	1	121

A quarta propriedade visitada (propriedade “D”) está localizada na cidade de Araras, SP. Nela, há somente animais puros de origem da raça Holandesa (Figura 3.10), criados no sistema de confinamento.



Figura 3.10 Propriedade rural localizada no município de Araras, SP, onde foi amostrado leite de 30 animais puros de origem (PO) da raça Holandesa

Ao final da ordenha de cada animal, coletaram-se 250 mL do compartimento medidor de volume do sistema. Do volume total amostrado:

- ✓ 50 mL foram separados para a contagem de células somáticas (CSS) e determinação da gordura, proteína, lactose, sólidos totais, extrato seco desengordurado e nitrogênio uréico
- ✓ 50 mL para a contagem bacteriana total (CBT)
- ✓ 150 mL foram destinados às determinações dos elementos químicos

Informações referentes às características dos 30 animais amostrados, como raça, número de partos e dias de lactação estão na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 - Características dos 30 animais puros de origem (PO) da raça Holandesa da propriedade rural localizada na cidade de Araras, SP

Número	Número de partos	Dias em lactação
01	2	284
02	2	164
03	2	205
04	2	322
05	2	68
06	2	60
07	2	63
08	2	120
09	2	330
10	2	129
11	2	60
12	2	216
13	2	35
14	2	203
15	2	396
16	1	236
17	2	383
18	1	232
19	1	188
20	1	244
21	1	249
22	1	85
23	1	264
24	1	66
25	1	148
26	3	120
27	4	62
28	7	213
29	3	173
30	3	204

### 3.1.5 RAÇÃO BOVINA

Com intuito de realizar um estudo exploratório com diferentes tipos de volumosos e concentrados destinados à alimentação bovina, amostrou-se aproximadamente 1 kg de cada material concomitantemente às coletas de amostras de leite nas 51 propriedades rurais visitadas nos estados de Minas Gerais e do Rio Grande do Sul.

## 3.2 PREPARO DAS AMOSTRAS

### 3.2.1 LEITE

Todas as amostras de leite coletadas nas fazendas leiteiras foram encaminhadas ao Laboratório de Radioisótopos em Piracicaba, SP. No laboratório, as amostras de leite foram acondicionadas em béquer e agitadas em agitador magnético por 5 minutos (Figura 3.11).

Após a agitação, 100 mL de cada amostra foram dispostos em placas de Petri, congelados e secos pelo processo de liofilização fazendo-se uso do equipamento Savant ModulyoD (Figura 3.12). Na sequência, os materiais liofilizados foram transferidos para embalagens de polietileno de alta densidade (PEAD) hermeticamente fechadas, buscando preservar assim suas características físico-químicas.



Figura 3.11 Béquer e agitador magnético utilizado na agitação das amostras de leite coletadas nas fazendas leiteiras e adquiridas no comércio



Figura 3.12 Liofilizador Savant ModulyoD utilizado na secagem das amostras de leite

### 3.2.2 RAÇÃO BOVINA

No Laboratório de Radioisótopos as amostras de ração bovina foram dispostas em bandejas de alumínio e secas em estufa com circulação de ar (FANEM 320-SE) a 60 °C até massa constante (Figura 3.13). Em seguida, reduziu-se o tamanho da partícula fazendo-se uso de moinho de rotor de titânio, FRITSCH Pulverisette 14 (Figura 3.14), obtendo-se partículas menores que 0,5 mm.



Figura 3.13 Estufa FANEM 320-SE utilizada na secagem das amostras de ração bovina



Figura 3.14 Moinho FRITSCH Pulverisette 14 utilizado para reduzir o tamanho de partícula das amostras

### 3.3 ANÁLISE QUÍMICA

#### 3.3.1 ANÁLISE POR ATIVAÇÃO NEUTRÔNICA INSTRUMENTAL

Para a análise por ativação neutrônica instrumental (INAA), as amostras foram analisadas em ocasiões distintas. Para tal, elas foram organizadas em grupos, considerando-se a semelhança da origem e matriz. Na Tabela 3.6, encontram-se os grupos de amostras, com suas respectivas identificações e lotes de irradiação.

Tabela 3.6 - Grupos de amostras analisadas com suas respectivas identificações e lotes de irradiação

<b>Grupo</b>	<b>Lote</b>	<b>Identificação</b>
1	HJ	Leite comercial
2	JJ	Representatividade amostral do silo de estocagem
3	JJ	Representatividade amostral do tanque de resfriamento
4	KB e KC	Leite amostrado em tanques de resfriamento de Minas Gerais
5	NP	Leite amostrado em tanques de resfriamento do Rio Grande do Sul
6	NG	Ração bovina

### 3.3.1.1 ENCAPSULAMENTO

Para cada lote analisado, porções analíticas de leite liofilizado de aproximadamente 0,35 g foram transferidas para cápsulas de polietileno de alta pureza fabricadas pela *Vrije Universiteit*, Amsterdã, Holanda (Figura 3.15) e lacradas com bastão de quartzo incandescente. Para a determinação da umidade residual, uma porção de 1 g deste mesmo material foi retirada durante o preenchimento das cápsulas e seca em estufa com circulação de ar a 85 °C até massa constante. O material excedente das amostras permaneceu armazenado nas embalagens PEAD.

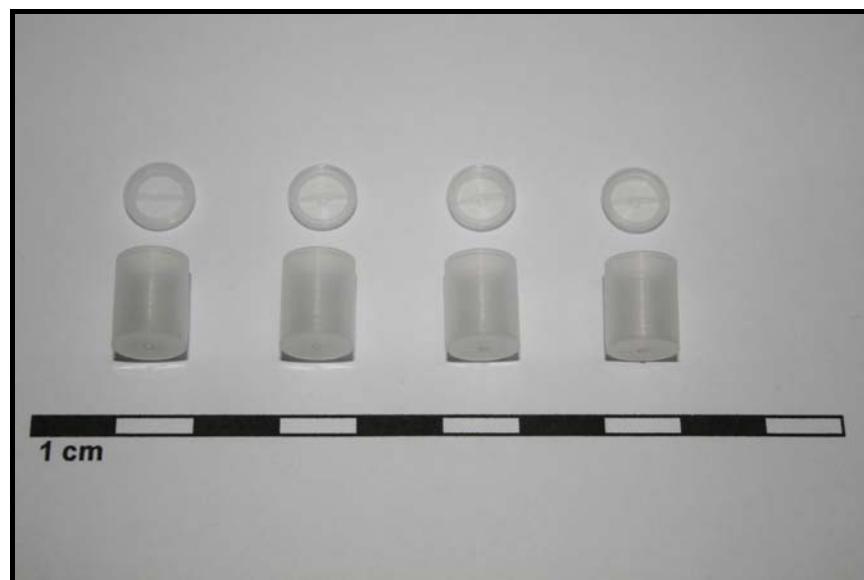


Figura 3.15 Cápsulas de polietileno de alta pureza fabricadas pela *Vrije Universiteit*, Amsterdã, Holanda

Fragmentos de aproximadamente 10 mg de fio de liga Ni-Cr, com fração de massa e incerteza combinada padrão para Cr de  $19,62 \pm 0,07\%$  (FRANÇA; FERNANDES; BACCHI, 2003), foram justapostos na parte superior e inferior de cada cápsula para monitorar a fluênci a de nêutrons térmicos. Em cada lote de amostras a serem irradiadas, foram adicionados materiais de referência certificados (MRCs) para controle da qualidade analítica (Tabela 3.7) e uma cápsula vazia como branco analítico.

Uma ilustração da distribuição das amostras, materiais de referência certificados, brancos analíticos e monitores de fluênci a de nêutrons, dentro dos recipientes de alumínio destinados à irradiação (“coelho”), pode ser visualizada na Figura 3.16.

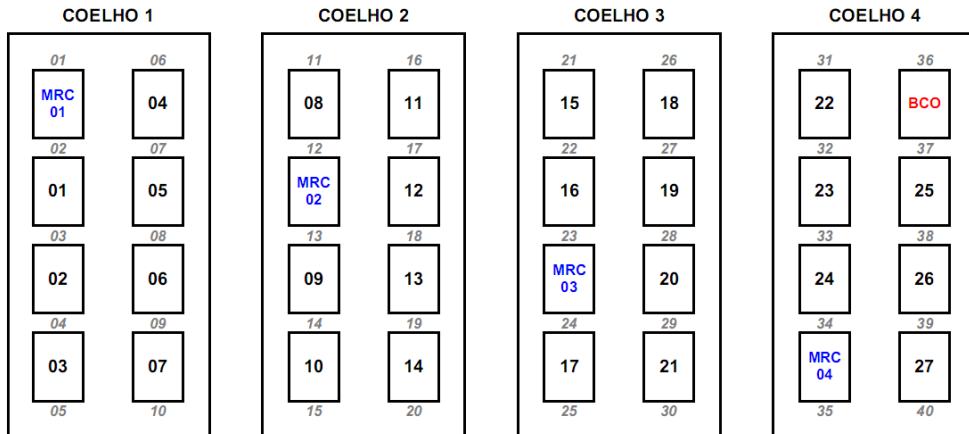


Figura 3.16 Distribuição de amostras, materiais de referência certificados, branco e monitores de fluência de nêutrons nos recipientes de irradiação (“coelhos”) em cada lote de amostras a serem irradiadas

Tabela 3.7 - Materiais de referência certificados utilizados nos lotes de amostras a serem irradiadas, com seus respectivos códigos, matrizes e produtores

Código	Matriz	Produtor	Lote
A-11	Milk Powder	IAEA	HJ, JJ, KB, KC e NP
MPH-2	Mixed Polish Herbs	INCT	HJ, JJ, KB, KC, NG e NP
SRM1515	Apple Leaves	NIST	JJ, KB, KC e NG
SRM1547	Peach Leaves	NIST	JJ, KB e KC
SRM1549	Non-Fat Milk Powder	NIST	NP
Soil-7	Soil	IAEA	NG
TL-1	Tea Leaves	INCT	HJ
V-10	Hay Powder	IAEA	HJ, JJ, KB, KC, NG e NP

IAEA – International Atomic Energy Agency, Áustria

INCT – Institute of Nuclear Chemistry and Technology, Polônia

NIST – National Institute of Standards and Technology, Estados Unidos

### 3.3.1.2 IRRADIAÇÃO

As irradiações ocorreram no reator nuclear de pesquisas IEA-R1 do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Comissão Nacional de Energia Nuclear (IPEN/CNEN) na cidade de São Paulo, SP. O tempo de irradiação foi de 8 horas (Figura 3.17). Para tal, utilizaram-se das prateleiras em que a variação da fluência de nêutrons fosse menor. Informações fornecidas pelo controle do reator nuclear de pesquisas acerca da posição, prateleira e fluência de nêutrons para os lotes analisados estão na Tabela 3.8.

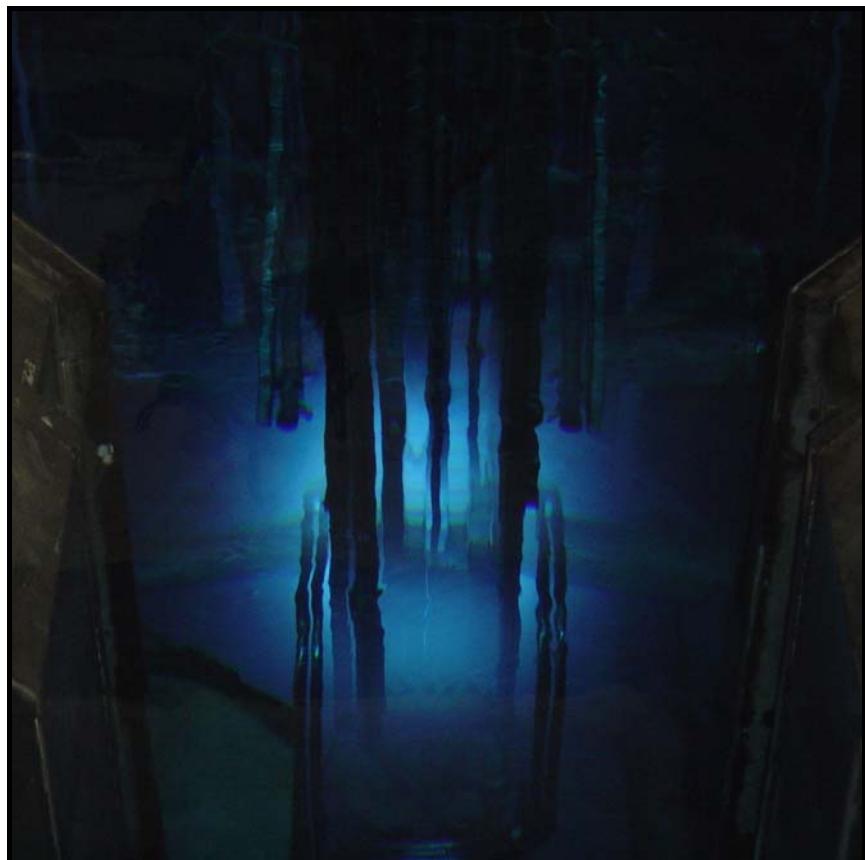


Figura 3.17 Reator nuclear de pesquisas IEA-R1 do IPEN/CNEN onde as amostras foram irradiadas

Ressalta-se que as amostras do grupo 1 (representatividade amostral do silo de estocagem) e do grupo 2 (representatividade amostral do tanque de resfriamento) foram irradiadas em conjunto (lote JJ). Por outro lado, as amostras do grupo 3 (leite amostrado em tanques de resfriamento de Minas Gerais), foram irradiadas em duas ocasiões distintas (lote KB e lote KC).

Tabela 3.8 - Posição, prateleira e fluênciade nêutrons térmicos fornecidas pelo controle do reator nuclear de pesquisas IEA-R1 do IPEN/CNEN para os lotes de amostras analisadas

<b>Lote</b>	<b>Posição</b>	<b>Prateleira</b>	<b>Fluênciade (<math>\times 10^{12} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}</math>)</b>
HJ	14A	4	8,5
	14A	5	10
	14A	6	9,7
	14A	7	8,9
JJ	13A	7	8,5
	13A	8	6,4
	14A	3	6,5
	14A	4	8,5
KB	24B	4	8,5
	24B	5	10
	24B	6	10
	24B	7	9,0
KC	24B	4	8,9
	24B	5	10
	24B	6	10
	24B	7	9,1
NG	14A	4	8,5
	14A	5	10
	14A	6	9,7
	14A	7	8,9
NP	14A	4	8,5
	14A	5	10
	14A	6	9,7

### 3.3.1.3 DETECÇÃO

Em virtude do tempo de resfriamento necessário para que o material irradiado possa ser manuseado e transportado até o LRI para as medições da radioatividade induzida, as amostras obrigatoriamente permanecem no IPEN/CNEN por aproximadamente 72 horas. Dessa forma, as quantificações químicas que envolvam radionuclídeos com meia-vida inferior a 12 horas ficam prejudicadas.

No LRI, para minimizar a exposição do usuário às radiações emitidas pelo material radioativo, todas as amostras são desembaladas e preparadas para a detecção da radioatividade induzida dentro da *glove box* (Figura 3.18), aparato projetado pelo Serviço de Proteção Radiológica (SPR) do CENA/USP especificamente para essa finalidade.



Figura 3.18 *Glove box* projetada pelo Serviço de Proteção Radiológica (SPR) do CENA/USP visando à minimização da exposição do usuário as radiações emitidas durante manipulação de amostras radioativas

A detecção da radioatividade induzida foi realizada em espectrômetros gama de alta resolução (Figura 3.19), sendo três coaxiais com 10 %, 45 % e 50 % de eficiência relativa ( $1332\text{ keV}$ ,  $^{60}\text{Co}$ ), modelos GEM 10195, GEM 45190 e GMX 50220, respectivamente, e um do tipo poço, modelo GWL 22015 com  $249\text{ cm}^3$  de volume ativo. Todos os detectores foram fabricados pela ORTEC.

Para quantificar o maior número possível de elementos químicos nas amostras, visto que os radionuclídeos possuem meias-vidas bastante variadas, realizaram-se quatro medições da radioatividade induzida. Para tal, procurou-se reduzir a distância amostra-detector a cada detecção, assim como aumentar o tempo de detecção. Informações das condições observadas nas detecções da radioatividade das amostras foram compiladas na Tabela 3.9.



Figura 3.19 Sala de espectrometria gama Prof. Dr. Epaminondas Sansígolo de Barros Ferraz

Para os monitores de fluxo, por haver interesse somente no radionuclídeo  $^{51}\text{Cr}$  ( $320\text{ keV}$ ,  $T_{1/2} = 27,7$  dias), realizaram-se duas medições de radioatividade, cujas condições de detecção estão na Tabela 3.10.

Tabela 3.9 - Condições observadas para as medições da radioatividade induzida das amostras, MRCs e brancos analíticos

<b>Lote</b>	<b>Medição</b>	<b>Detector</b>	<b>Decaimento (dias)</b>	<b>Distância (mm)</b>	<b>Tempo (s)</b>
HJ	1	GEM 45190	3,9 – 4,9	353, 344, 283 e 187	1800
	2	GMX 50220	7,6 – 11	38	3600
	3	GMX 50220	21 – 29	8	7200
	4	GWL 22015	43 – 49	-	7200
JJ	1	GEM 45190	5,7 – 6,1	112	1200
	2	GEM 45190	6,4 – 7,5	60	2700
	3	GEM 45190	16 – 19	6	5500
	4	GEM 45190	33 – 36	5	7200
KB	1	GEM 45190	7,6 – 8,2	29	1800
	2	GMX 50220	8,8 – 10	38	2700
	3	GEM 45190	23 – 25	10	5400
	4	GEM 45190	37 – 41	17	7200
KC	1	GMX 50220	7,2 – 7,8	76	1800
	2	GEM 45190	8,4 – 9,7	16	2700
	3	GMX 50220	23 – 25	18	5400
	4	GEM 45190	41 – 44	17	7200
NG	1	GMX 50220	4,0 – 4,4	493, 368, 221 e 118	1200
	2	GEM 45190	5,5 – 6,8	133, 86 e 18	2400
	3	GMX 50220	14 – 16	60 e 12	3600
	4	GMX 50220	42 – 48	8	7200
NP	1	GMX 50220	3,9 – 4,6	458	1800
	2	GMX 50220	6,6 – 8,1	116	2700
	3	GMX 50220	14 – 17	29	5400
	4	GMX 50220	28 – 34	8	7200

Tabela 3.10 - Condições observadas para as medições da radioatividade induzida dos monitores de fluência de nêutrons

Lote	Medição	Detector	Decaimento (dias)	Distância (mm)	Tempo (s)
HJ	1	GEM 45190	15	67	130
	2	GEM 10195	52	28	100
JJ	1	GEM 45190	29	118	120
	2	GMX 50220	36	59	130
KB	1	GEM 45190	45	49	60
	2	GMX 50220	46	66	70
KC	1	GEM 45190	44	49	70
	2	GMX 50220	45	66	80
NG	1	GMX 50220	42	66	100
	2	GEM 45190	46	65	120
NP	1	GEM 45190	44	57	80
	2	GMX 50220	78	67	200

### 3.3.1.4 CÁLCULO

Os resultados das frações de massa foram obtidos pelo método  $k_0$  de padronização seguindo-se os procedimentos criados por Bacchi, Fernandes e França (2000a) e Bacchi, Fernandes e Oliveira (2000b). Para a realização dos cálculos, utilizaram-se dos aplicativos Quantu-MCA e Quantu-INAA (Figura 3.20) desenvolvidos pelo Dr. Márcio Arruda Bacchi no Laboratório de Radioisótopos (BACCHI; FERNANDES, 2003).

Inicialmente, todos os espectros foram avaliados pelo programa Quantu-MCA, sendo que a procura e o ajuste dos fotópicos de interesse foram realizados de forma automatizada para os espectros selecionados. Para a obtenção da fluência de

nêutrons, frações de massa dos elementos nas amostras e incertezas combinadas associadas a cada valor, utilizou-se do aplicativo Quantu-INAA. Na Tabela 3.11, foram listadas informações referentes aos radionuclídeos utilizados nas quantificações de alguns elementos químicos, seguidos de suas respectivas meias-vidas e os parâmetros  $k_0$  dos dois fotópicos de maior intensidade para cada radionuclídeo de interesse.

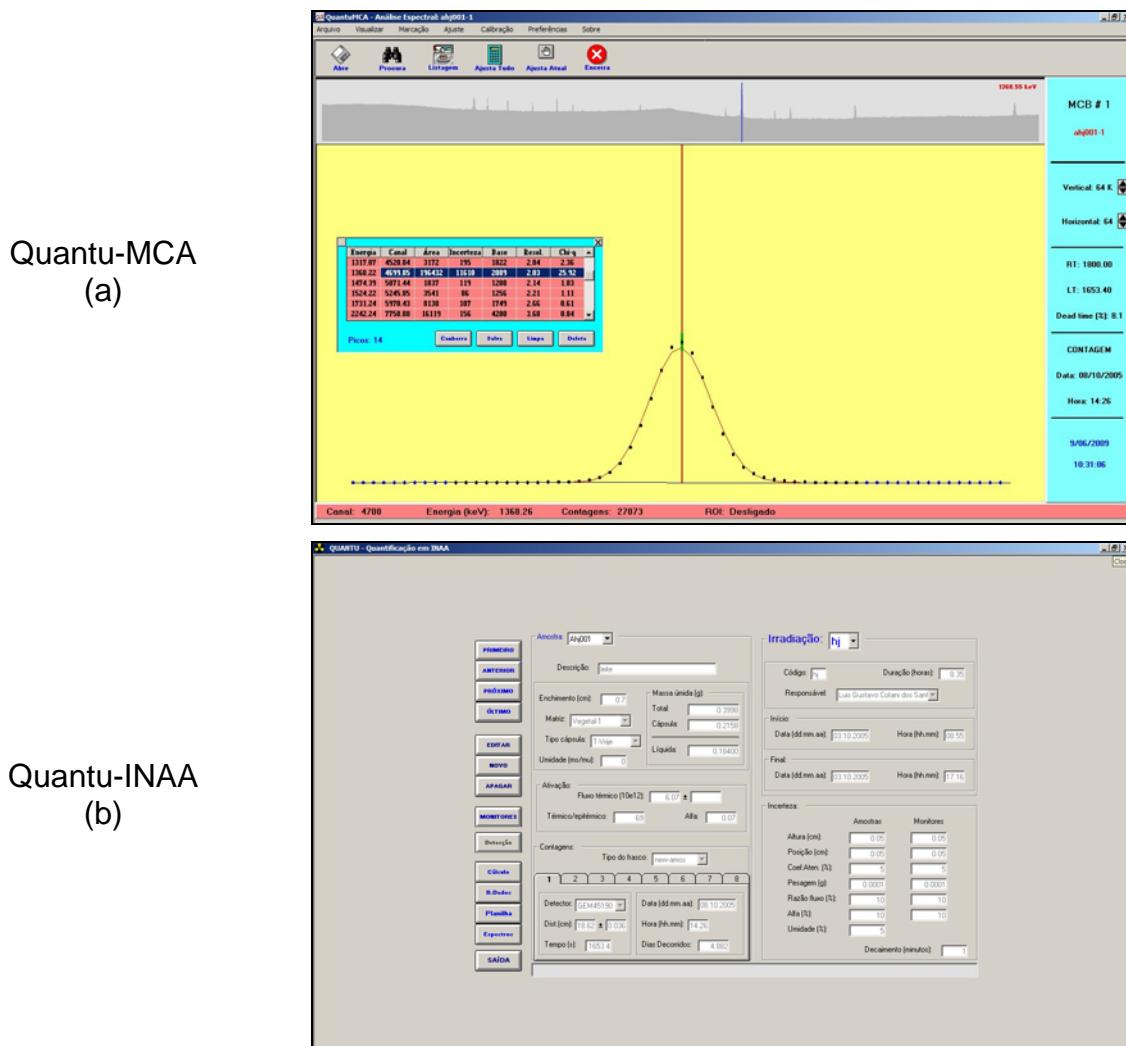


Figura 3.20 Interface gráfica do usuário (GUI) dos aplicativos Quantu-MCA (a) e Quantu-INAA (b)

Tabela 3.11 - Radionuclídeos utilizados na quantificação química de alguns elementos químicos, constando suas meias-vidas (dias), energia (keV) e parâmetro  $k_0$  para os fotópicos de maior intensidade. Fonte: aplicativo Quantu-INAA (BACCHI; FERNANDES, 2003)

<b>Elemento</b>	<b>Radionuclídeo</b>	<b>Meia-vida</b>	<b>Energia</b>	<b><math>k_0</math></b>
As	$^{76}\text{As}$	1,097	559,08	$4,83 \times 10^{-2}$
Br	$^{82}\text{Br}$	1,4708	554,30 776,50	$2,38 \times 10^{-2}$ $2,76 \times 10^{-2}$
Ca	$^{47}\text{Ca}$	4,536	1297,06	$9,54 \times 10^{-7}$
Cd	$^{115\text{m}}\text{In}$ ( $^{115}\text{Cd}$ )	2,228	336,20	$7,73 \times 10^{-4}$
Co	$^{60}\text{Co}$	1925	1173,24 1332,50	$1,32 \times 10^{+0}$ $1,32 \times 10^{+0}$
Cr	$^{51}\text{Cr}$	27,7	320,08	$2,62 \times 10^{-3}$
Fe	$^{59}\text{Fe}$	44,496	1099,25 1291,60	$7,77 \times 10^{-5}$ $5,93 \times 10^{-5}$
K	$^{42}\text{K}$	0,515	1524,58	$9,46 \times 10^{-4}$
La	$^{140}\text{La}$	1,678	487,02 1596,54	$6,37 \times 10^{-2}$ $1,34 \times 10^{-1}$
Na	$^{24}\text{Na}$	0,624	1368,60	$4,62 \times 10^{-2}$
Rb	$^{86}\text{Rb}$	18,66	1076,69	$7,65 \times 10^{-4}$
Sc	$^{46}\text{Sc}$	83,82	889,25 1120,51	$1,22 \times 10^{+0}$ $1,22 \times 10^{+0}$
Zn	$^{65}\text{Zn}$	244,1	1115,52	$5,72 \times 10^{-3}$

O limite de detecção também foi obtido com o software Quantu-INAA, cujos critérios foram extraídos de Alfassi (1994b), conforme descrito na Equação 3.

$$N_P \geq 3\sqrt{N_B} \quad (3)$$

onde:

$N_P$  = número de contagens detectáveis no fotópico característico

$N_B$  = número de contagens do *background* da região de interesse

### 3.3.2 ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO

Para a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), as amostras foram analisadas em duplicata. Mais informações sobre as amostras podem ser visualizadas na Tabela 3.12.

Tabela 3.12 - Grupo de amostras analisadas com suas respectivas identificações

Grupo	Identificação
1	Leite amostrado em tanques de resfriamento de Minas Gerais
2	Leite amostrado em tanques de resfriamento do Rio Grande do Sul
3	Leite amostrado nos animais da propriedade “A”
4	Leite amostrado nos animais da propriedade “B”
5	Leite amostrado nos animais da propriedade “C”
6	Leite amostrado nos animais da propriedade “D”
7	Ração bovina

### 3.3.2.1 DIGESTÃO

As amostras de leite e ração bovina foram digeridas em sistema fechado no Laboratório de Química Analítica do CENA/USP. Porções analíticas de 250 mg de amostra, 6 mL de ácido nítrico<sup>1</sup> ( $\text{HNO}_3$ ) a 20 % (v/v) e 2 mL de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a 30 % (v/v) foram acondicionados em recipientes de Teflon® PFA. Posteriormente, os recipientes foram inseridos no forno de microondas Milestone ETHOS 1600 (Figura 3.21), fazendo-se uso do programa de digestão esquematizado na Tabela 3.13.



Figura 3.21 Forno de microondas Milestone ETHOS 1600 Microwave Digestion Labstation, utilizado na digestão das amostras de leite e ração bovina

<sup>1</sup> Purificado por destilação abaixo do ponto de ebulação (*sub-boiling*)

Tabela 3.13 - Programa de digestão utilizado no equipamento Milestone ETHOS 1600 Microwave Digestion Labstation, onde  $\Delta t$  é o tempo de duração do estágio,  $\Delta T$  e  $T_{\max}$  são, respectivamente, a variação de temperatura e a temperatura máxima atingida no interior do recipiente de Teflon® PFA e  $P_{\max}$  é a potência máxima de operação do microondas

Estágio	$\Delta t$ (min)	$\Delta T$ (°C)	$T_{\max}$ (°C)	$P_{\max}$ (W)
1	3	Aquecimento	160	1000
2	2	Resfriamento	160	0
3	5	Aquecimento	210	1000
4	15	Estável	210	1000
5	30	Resfriamento	210	0

Na Figura 3.22, visualiza-se a curva de digestão característica gerada pelo aplicativo destinado à programação do forno de microondas, com a temperatura programada (linha rosa) e temperatura real (linha vermelha) dentro dos recipientes de Teflon® PFA, além da temperatura interna (linha verde) e potência do equipamento (linha marron).

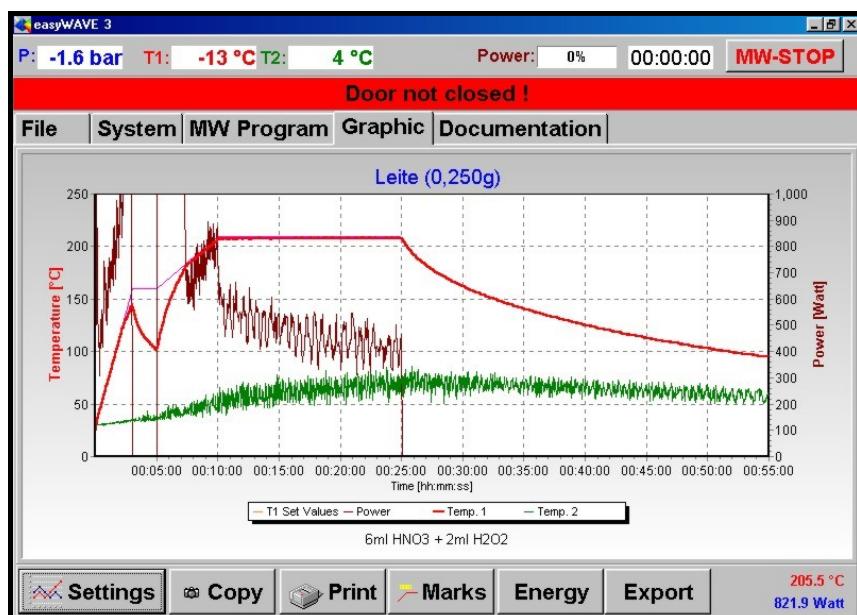


Figura 3.22 Curva de digestão característica gerada pelo aplicativo destinado à programação do tempo, temperatura e potência do forno de microondas Milestone ETHOS 1600

Após o término dos 5 estágios, adicionou-se água deionizada de alta pureza, obtida pelo sistema de purificação Milli-Q, até completar 25 mL.

### 3.3.2.2 DETERMINAÇÕES QUÍMICAS

Todas as razões massa/carga ( $m/z$ ) foram mensuradas no Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais, do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) da Universidade de São Paulo (USP), fazendo-se uso do espectrômetro de massas ELAN DRC II ICP-MS da Perkin-Elmer (Figura 3.23).

Com a solução estoque da Perkin-Elmer, contendo  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  de cada elemento químico de interesse, foram preparadas soluções-padrão de  $0 \mu\text{g L}^{-1}$  a  $20 \mu\text{g L}^{-1}$ . Como padrão interno, utilizou-se da solução com  $10 \mu\text{g/L}$  de Rh. Materiais de referência certificados (Tabela 3.14) foram empregados para controle da qualidade analítica.



Figura 3.23 Espectrômetro de massas ELAN DRC II ICP-MS da Perkin-Elmer

Para o ICP-MS, seguiram-se os procedimentos operacionais propostos por Nardi et al. (2009).

Tabela 3.14 - Materiais de referência certificados utilizados, com seus respectivos códigos, nomes e produtores para cada grupo de amostras analisadas

<b>Código</b>	<b>Matriz</b>	<b>Produtor</b>	<b>Grupo</b>
A-11	<i>Milk Powder</i>	IAEA	1, 2, 3, 4, 5 e 6
MPH-2	<i>Mixed Polish Herbs</i>	INCT	1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7
SRM1515	<i>Apple Leaves</i>	NIST	1, 2 e 7
SRM1547	<i>Peach Leaves</i>	NIST	1, 2, 3, 4, 5 e 6
SRM1549	<i>Non-Fat Milk Powder</i>	NIST	1, 2, 3, 4, 5 e 6
Soil-7	<i>Soil</i>	IAEA	7
V-10	<i>Hay Powder</i>	IAEA	1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7

IAEA – International Atomic Energy Agency, Áustria

INCT – Institute of Nuclear Chemistry and Technology, Polônia

NIST – National Institute of Standards and Technology, Estados Unidos

### 3.4 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DA QUALIDADE (INSTRUÇÃO NORMATIVA 51)

As determinações da composição (gordura, proteína, lactose, extrato seco total e desengordurado), contagem de células somáticas (CCS), contagem bacteriana total (CBT), resíduos de antibióticos (ATB) e nitrogênio uréico (NU) foram realizadas na Clínica do Leite, da ESALQ/USP. A Clínica do Leite configura-se como o único laboratório credenciado junto à Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite (RBQL) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) do estado de São Paulo.

Apesar de ser responsabilidade da Clínica do Leite a análise e a emissão dos laudos referentes às análises, contudo, cabe ao solicitante garantir que as amostras cheguem ao laboratório em condições propícias para serem analisadas. Assim sendo, seguiram-se os procedimentos compilados no “Manual de Coleta e Conservação de Amostras” (CASSOLI; MACHADO, 2007), elaborado pela própria Clínica do Leite.

Para a determinação da composição (gordura, proteína, lactose, extrato seco total e desengordurado), contagem de células somáticas e nitrogênio uréico, adicionou-se ao recipiente fornecido pela própria Clínica do Leite uma pastilha contendo 8 mg de Bronopol ( $C_3H_6BrNO_4$ ; CAS: 52-51-7) e 0,30 mg de Natamicina ( $C_{33}H_{47}NO_{13}$ ; CAS: 7681-93-8). Para a determinação da contagem bacteriana total, acrescentaram-se 4 gotas do bacteriostático azidiol ( $NaN_3$ ; CAS: 26628-22-8) ao frasco. As amostras destinadas à verificação da existência de resíduo de antibióticos foram congeladas logo após a coleta. Todas as amostras referentes à composição, CCS, CBT e NU foram mantidas refrigeradas, sendo que a temperatura desde a coleta até a entrega na Clínica do Leite não excedeu 10 °C.

Ressalta-se que, no dia 20 de novembro de 2008, foi publicado no Diário Oficial da União o credenciamento da Clínica do Leite junto à Coordenação Geral de Apoio Laboratorial, da Secretaria de Defesa Agropecuária - CGAL/SDA (Portaria 197 de 19 de Novembro de 2008) para realização de Análises de Controle da Qualidade.

### 3.5 CONTROLE DA QUALIDADE DO PROCEDIMENTO ANALÍTICO

#### 3.5.1 EXATIDÃO DOS RESULTADOS DAS ANÁLISES

Avaliou-se a exatidão dos resultados das análises calculando-se os valores  $E_n$  para todos os elementos químicos determinados nos procedimentos analíticos. Para tal, considerou-se a Equação 4 (ISO/IEC GUIDE 43-1, 1997):

$$E_n = \frac{x - X}{\sqrt{I_x^2 + I_X^2}} \quad (4)$$

onde:

$E_n$  = número  $E_n$

$x$  = resultado determinado (mg/kg)

$X$  = valor de referência reportado no certificado (mg/kg)

$I_x$  = incerteza expandida do resultado obtido, nível de 95% de confiança

$I_X$  = incerteza expandida do valor de referência, nível de 95% de confiança

Consideram-se aceitáveis valores  $E_n$  que estão entre -1 e 1 para cada elemento químico avaliado, ou seja,  $-1 \leq E_n \leq 1$ .

#### 3.5.2 REPRODUTIBILIDADE AO LONGO DOS ESTUDOS

Segundo o Instituto Nacional de Metrologia, Normatização e Qualidade Industrial, a reprodutibilidade indica a concordância entre os resultados das medições de um mesmo mensurando efetuadas sob condições variadas de medição (INMETRO, 2007b). Assim sendo, para estimar a reprodutibilidade dos procedimentos analíticos ao longo do tempo, avaliou-se o grau de concordância entre

os resultados dos diversos lotes de amostras analisados por INAA e ICP-MS. Para tal, foram empregados os materiais de referência A-11 (*Milk Powder*), MPH-2 (*Mixed Polish Herbs*) e V-10 (*Hay Powder*).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 LEITE COMERCIAL

A matéria seca e densidade das 25 amostras de leite comercial estão na Tabela 4.1. As concentrações e incertezas expandidas de Br, Ca, Co, Cs, Fe, K, Na, Rb e Zn determinados nas 25 amostras de leite analisadas estão na Tabela 4.2. Dentre esses elementos químicos, sete (Br, Ca, Cs, K, Na, Rb e Zn) estavam acima do limite de detecção em todas as amostras. Co foi quantificado em quatro amostras, sendo que a maior concentração foi determinada na amostra 02 (leite desnatado –  $4,80 \pm 0,51$  mg/L). A concentração de Fe determinado na amostra 25 (leite integral enriquecido com Fe –  $28,9 \pm 1,3$  mg/L) foi maior em relação à concentração desse elemento químico na amostra 2 (leite desnatado –  $1,60 \pm 0,17$  mg/L).

Os resultados das concentrações para leites desnatados, leites integrais e leites especiais são similares, ou seja, não se encontraram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) para os elementos químicos Br, Ca, Cs, K, Na, Rb e Zn (Figura 4.1).

Tabela 4.1 - Matéria seca e densidade das amostras de leite comercial adquiridos no comércio da cidade de Piracicaba, SP

<b>Número</b>	<b>Matéria seca (g/L)</b>	<b>Densidade (g/mL)</b>
<b>01</b>	89,7	1,014
<b>02</b>	85,0	1,009
<b>03</b>	102	1,010
<b>04</b>	94,1	1,013
<b>05</b>	75,9	1,011
<b>06</b>	83,6	1,007
<b>07</b>	78,2	1,016
<b>08</b>	78,8	1,032
<b>09</b>	85,5	1,011
<b>10</b>	97,7	1,015
<b>11</b>	99,1	1,006
<b>12</b>	112	1,005
<b>13</b>	113	1,007
<b>14</b>	115	1,013
<b>15</b>	111	1,008
<b>16</b>	115	1,012
<b>17</b>	118	1,011
<b>18</b>	114	0,999
<b>19</b>	114	1,010
<b>20</b>	124	1,013
<b>21</b>	99,3	1,018
<b>22</b>	99,7	1,018
<b>23</b>	95,6	1,016
<b>24</b>	112	1,019
<b>25</b>	117	1,015

Tabela 4.2 - Concentrações (em mg/L) em base úmida (Co e Cs em µg/L) e incertezas expandidas ( $k = 2$ )

Número	Br	Ca	Co	Cs	Fe	K	Na	Rb	Zn
01	3,63 0,18	1185 53	< 0,62	11,1 1,1	< 0,44	1433 71	548 27	2,79 0,11	4,11 0,12
02	3,71 0,17	1121 59	4,80 0,51	14,7 1,2	1,60 0,17	1483 76	624 34	2,77 0,12	3,62 0,12
03	3,96 0,19	1203 51	< 0,51	17,0 1,4	< 0,40	1709 81	667 30	4,75 0,20	4,02 0,13
04	1,180 0,065	1161 46	< 0,46	9,7 1,0	< 0,37	1617 74	316 9,3	3,49 0,14	4,22 0,13
05	1,599 0,083	908 45	< 0,38	13,3 1,3	< 0,30	1310 140	548 23	3,53 0,14	3,108 0,098
06	1,502 0,075	955 42	< 0,50	22,4 1,7	< 0,33	1353 66	564 25	4,98 0,25	2,93 0,10
07	1,062 0,054	962 46	< 0,54	8,54 0,92	< 0,31	1262 69	677 31	2,65 0,11	3,31 0,10
08	2,82 0,12	901 38	< 0,53	11,30 0,99	< 0,38	1259 69	588 23	2,57 0,11	3,106 0,092
09	1,428 0,068	1090 51	< 0,59	12,0 1,0	< 0,34	1488 76	516 25	3,03 0,12	3,89 0,14
10	4,53 0,19	1088 58	< 0,48	24,0 1,7	< 0,39	1425 77	626 29	3,42 0,15	3,37 0,13
11	1,763 0,079	788 49	< 0,49	20,9 1,6	< 0,30	1340 59	591 30	4,28 0,17	2,325 0,079
12	3,30 0,16	980 67	< 0,33	10,91 0,89	< 0,33	1247 89	490 22	2,24 0,10	3,79 0,11
13	3,17 0,14	1026 45	1,47 0,56	16,3 1,2	< 0,34	1310 150	541 23	2,21 0,10	3,36 0,11
14	3,19 0,16	1053 79	< 0,57	15,6 1,2	< 0,34	1426 57	623 34	2,43 0,10	3,58 0,12
15	3,51 0,17	1024 44	< 0,66	16,7 1,4	< 0,33	1388 88	738 33	4,28 0,18	3,349 0,099
16	1,536 0,068	1058 68	< 0,57	23,0 1,7	< 0,34	1297 91	546 23	4,13 0,17	3,21 0,10
17	1,313 0,059	1055 47	< 0,59	11,9 1,1	< 0,35	1418 82	492 23	3,30 0,13	3,69 0,11
18	1,268 0,069	1006 46	< 0,57	9,0 1,0	< 0,34	1440 69	503 23	2,67 0,13	3,61 0,11
19	1,390 0,068	972 45	< 0,68	19,6 1,5	< 0,45	1458 90	531 23	5,21 0,20	2,927 0,079
20	1,394 0,073	1089 49	< 0,61	12,5 1,3	< 0,37	1468 86	771 37	3,56 0,15	3,98 0,11
21	2,46 0,13	1238 68	< 0,58	10,82 0,97	< 0,39	1647 97	604 29	2,70 0,13	4,17 0,12
22	2,33 0,11	1097 69	< 0,59	12,7 1,1	< 0,39	1587 69	441 20	2,57 0,11	4,01 0,12
23	4,33 0,19	1092 56	1,51 0,19	27,3 1,9	< 0,28	1468 66	668 28	3,24 0,13	3,26 0,10
24	4,29 0,22	1067 55	1,87 0,66	42,9 3,3	< 0,33	1408 77	616 33	3,41 0,15	3,45 0,11
25	1,769 0,081	1029 69	< 0,69	9,60 0,92	28,9 1,3	1272 92	532 23	1,96 0,81	3,77 0,12

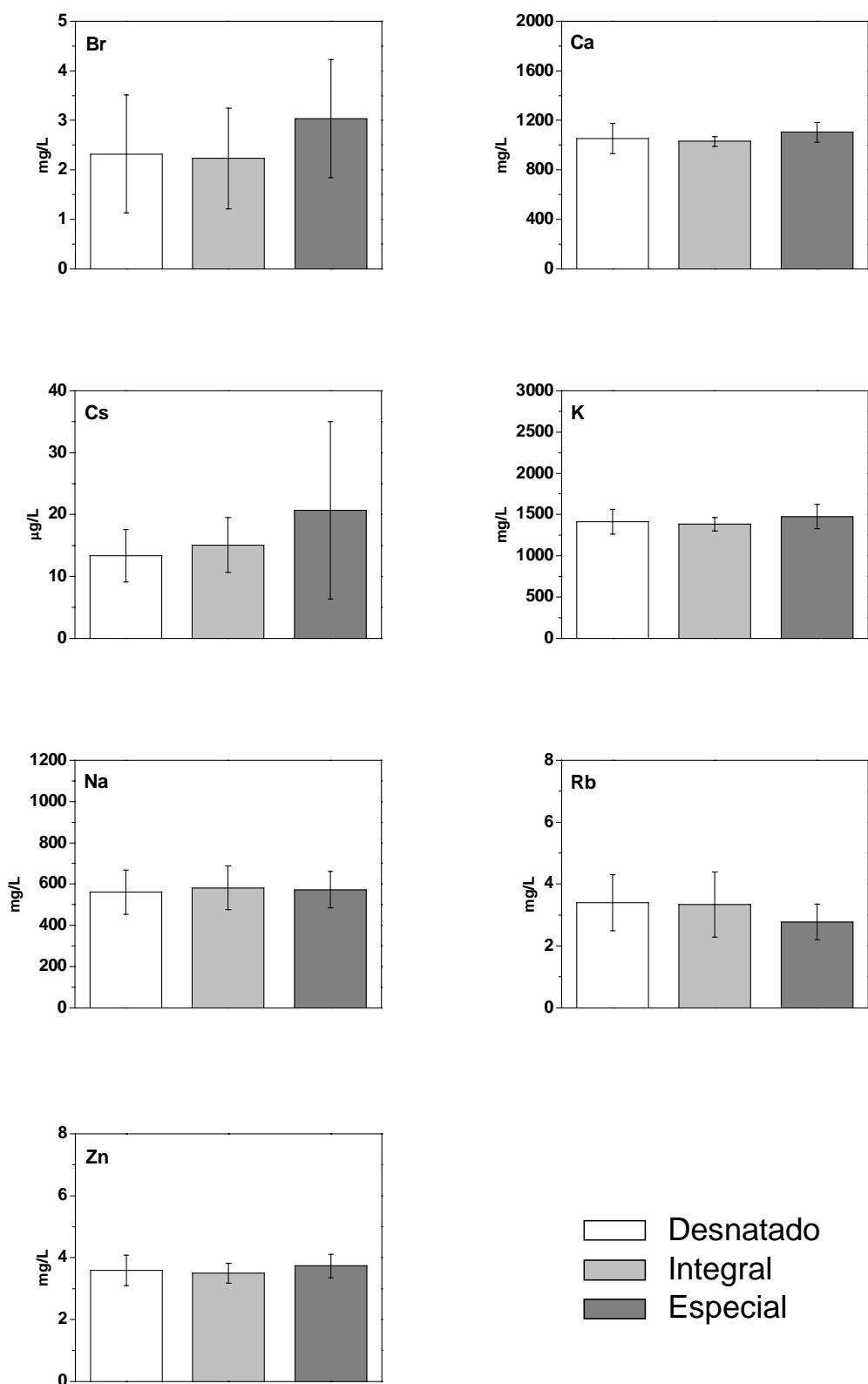


Figura 4.1 Média das concentrações (em mg/L exceto para Cs em  $\mu\text{g/L}$ ) para as amostras de leite desnatado ( $n = 9$ ), leite integral ( $n = 9$ ) e leites especiais ( $n = 5$ ). Barras de erros representam o desvio-padrão

A média das concentrações de Ca (1050 mg/L), K (1420 mg/L) e Na (574 mg/L) obtidas neste trabalho foram menores que os valores reportados para dez amostras de leite UHT enriquecido com Ca da Espanha, com 1480 mg/L, 1830 mg/L e 704 mg/L, respectivamente (LA FUNTE; BELLOQUE; JUÁREZ, 2004). Para Zn, a média da concentração foi próxima ao valor da mediana (2,67 mg/kg base úmida) encontrada em leites bovinos da Itália, assumindo a densidade do leite aproximadamente a 1g/mL (LICATA et al., 2004).

Considerando todas as 25 amostras, Ca, K e Zn apresentaram baixa variabilidade (Figura 4.2), enquanto os maiores coeficientes de variação (CV) foram observados para Cs, Br, Rb e Na (em ordem decrescente). A baixa variabilidade de Ca e K é confirmada por dados da literatura (LA FUNTE; BELLOQUE; JUÁREZ, 2004), indicando que as concentrações desses dois elementos químicos não são influenciadas por diferentes marcas comerciais e tipos de leites (desnatado, integral e especial).

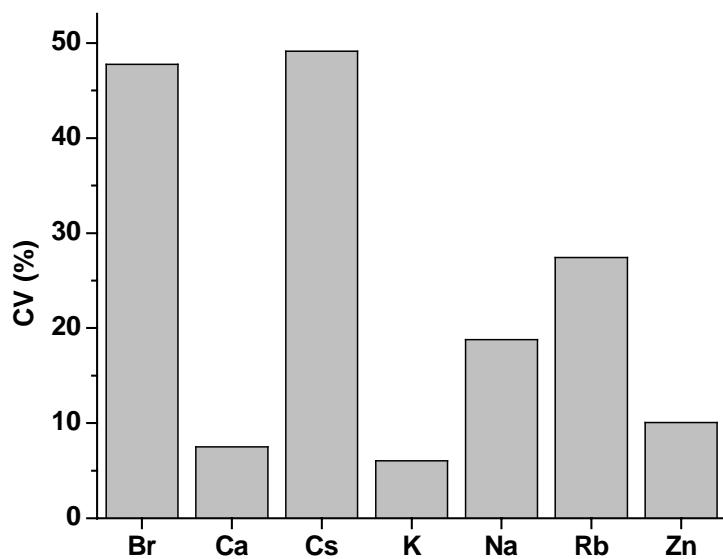


Figura 4.2 Coeficiente de variação (CV) para todas as 25 amostras de leite analisadas

Contudo, Licata et al. (2004) relatam grande variação para a concentração de Zn (0,025 – 4,96 mg/kg), discordando da baixa variação observada aqui.

Os resultados para Ca e Na foram comparados com os valores nutricionais fornecidos nas embalagens dos leites comerciais (Figura 4.3). Uma concordância razoável pôde ser observada para Ca, com valores similarmente distribuídos tanto acima como abaixo das concentrações informadas. Diferenças abaixo de 30 % foram encontradas para 22 amostras, chegando a 63 % para a amostra 19. Como o Ca é um nutriente essencial, valores abaixo do informado podem representar risco à saúde do consumidor. A quantidade mensurada para 15 amostras foi inferior ao valor informado, sendo essa diferença inferior a 20 % para 10 amostras. Para Na, houve pouca concordância com os valores informados, visto que 19 das 25 amostras apresentaram concentrações superiores, com variação de 190 % para a amostra 15. Observando as quatro amostras com as maiores diferenças, verifica-se que os valores informados nas embalagens são demasiado baixos em comparação com a maioria das outras marcas. Entretanto, há de se lembrar que altas concentrações de Na podem ser prejudiciais à saúde (CHEN; OROSZI; MORRIS, 2006).

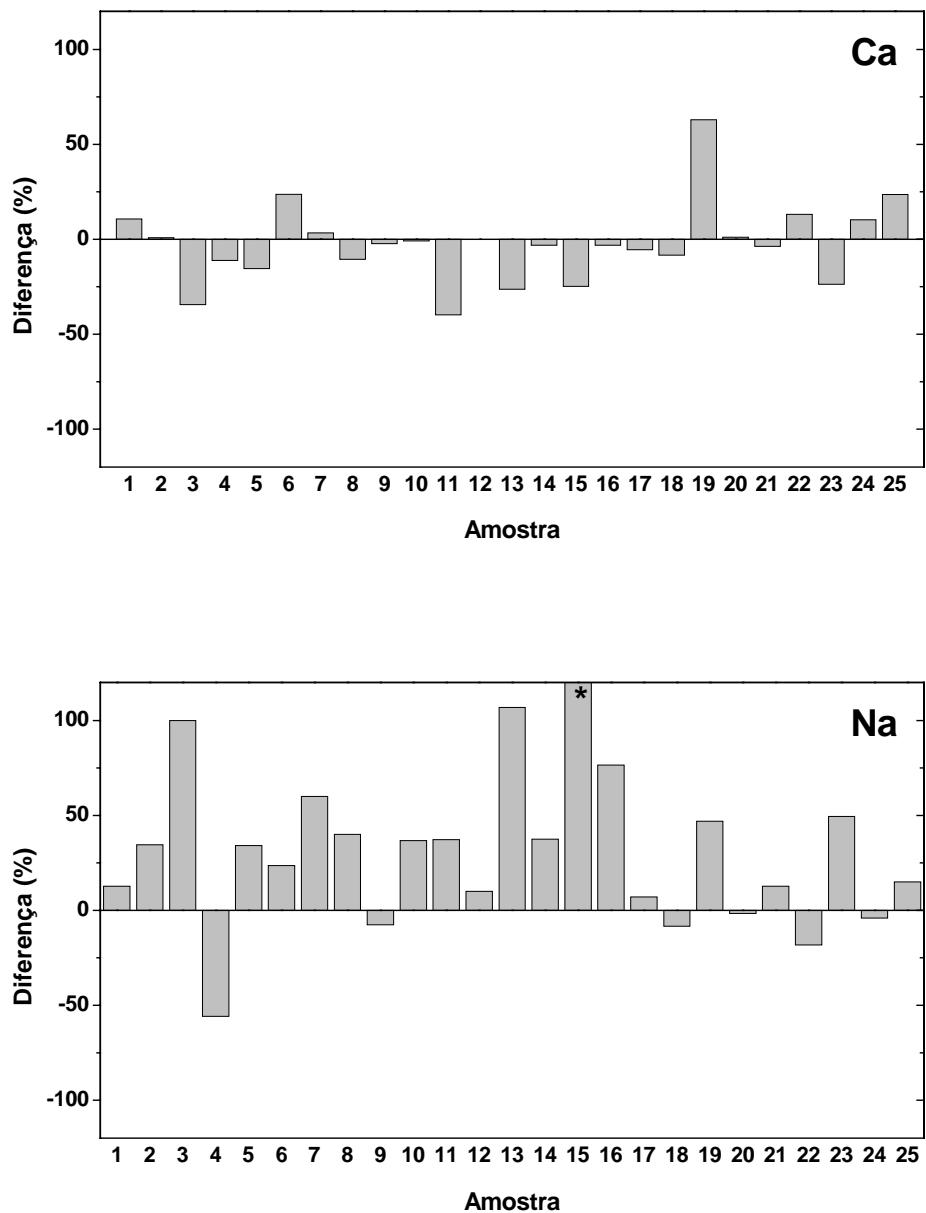


Figura 4.3 Desvios de Ca e Na em relação aos valores informados nas embalagens de leite. \* O desvio relativo de Na para a amostra 15 é 190 %

Os resultados deste estudo foram publicados no volume 276 (2008) do *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, sob o título “Characterization of Brazilian commercial milks by instrumental neutron activation analysis” (DOI: 10.1007/s10967-007-0417-5).

#### 4.2 REPRESENTATIVIDADE AMOSTRAL

Os elementos químicos Br, Ca, Cs, K, Na, Rb e Zn foram determinados no leite tanto do silo de estocagem de Arapuá, MG, quanto do tanque de resfriamento da ESALQ/USP, Piracicaba, SP. A fração de massa e a incerteza expandida para ambos os experimentos estão na Tabela 4.3 e Tabela 4.4, respectivamente, expressas em  $\mu\text{g/g}$  base seca. Ca, K e Na mostraram resultados similares em ambas as localidades, uma vez que todos os valores estão entre os limites das incertezas expandidas. Entretanto, Br, Cs, Rb e Zn, presentes em menores quantidades, apresentaram resultados diferentes. Tais diferenças observadas entre a composição química do leite das duas localidades estudadas eram esperadas, visto que o leite foi originado de raças de animais, manejos e regiões geográficas distintos.

A distribuição homogênea dos elementos químicos investigados no leite oriundo do silo de estocagem é evidenciada comparando-se a incerteza padrão da média ( $Inc$ ) com o desvio-padrão (DP) para as 10 repetições (Tabela 4.3). Com exceção de K, todos os elementos apresentaram desvio-padrão menor que a incerteza padrão da média, cuja variabilidade dos resultados é esclarecida pelas incertezas dos procedimentos analíticos. Por essa razão, para esses elementos químicos, nenhum grau de heterogeneidade foi detectado. Considerando que as incertezas foram corretamente estimadas, a variabilidade de K não pôde ser completamente explicada pela incerteza do procedimento analítico observando-se pequeno grau de heterogeneidade (1,6 %). Para o tanque de resfriamento (Tabela 4.4), todos os desvios-padrão foram menores que a incerteza padrão média, não se observando heterogeneidade.

Tabela 4.3 - Fração de massa e incerteza expandida ( $k=2$ ) expressas em  $\mu\text{g/g}$  base seca para amostras coletadas no silo de estocagem em Arapuá, MG

<b>Número</b>	<b>Br</b>	<b>Ca</b>	<b>Cs</b>	<b>K</b>	<b>Na</b>	<b>Rb</b>	<b>Zn</b>
<b>01</b>	11,0	8400	0,128	11800	3360	19,8	31,9
	0,5	440	0,009	540	210	1,4	2,7
<b>02</b>	10,9	8570	0,131	11500	3340	19,5	31,7
	0,5	410	0,009	530	150	1,6	2,2
<b>03</b>	11,0	8870	0,132	11600	3370	19,6	32,9
	0,5	440	0,009	560	160	1,5	2,8
<b>04</b>	11,0	8780	0,134	11700	3370	19,6	32,7
	0,5	370	0,009	500	190	1,5	3,7
<b>05</b>	11,2	8720	0,132	11800	3400	19,9	33,5
	0,5	450	0,009	500	180	1,4	2,8
<b>06</b>	11,6	8790	0,138	12100	3510	20,7	33,0
	0,6	420	0,010	510	240	1,5	3,0
<b>07</b>	10,9	8720	0,128	11900	3320	19,3	31,9
	0,5	440	0,011	550	140	1,5	2,4
<b>08</b>	11,3	8930	0,137	12100	3460	20,0	33,4
	0,5	570	0,010	630	150	1,7	2,5
<b>09</b>	11,5	8990	0,139	12700	3500	20,3	33,3
	0,5	500	0,010	630	150	1,5	2,3
<b>10</b>	11,2	8440	0,134	12000	3450	19,9	31,0
	0,5	490	0,010	550	140	1,4	2,3
<b>Média</b>	<b>11,2</b>	<b>8720</b>	<b>0,133</b>	<b>11900</b>	<b>3410</b>	<b>19,9</b>	<b>32,6</b>
<b>Inc</b>	<b>0,3</b>	<b>230</b>	<b>0,005</b>	<b>280</b>	<b>87</b>	<b>0,8</b>	<b>1,4</b>
<b>DP</b>	<b>0,2</b>	<b>200</b>	<b>0,004</b>	<b>340</b>	<b>70</b>	<b>0,4</b>	<b>0,8</b>
<b>CV</b>	<b>2,2</b>	<b>2,3</b>	<b>2,9</b>	<b>2,8</b>	<b>2,0</b>	<b>2,1</b>	<b>2,6</b>

*Inc = incerteza padrão média (n=10)*

Tabela 4.4 - Fração de massa e incerteza expandida ( $k=2$ ) expressas em  $\mu\text{g/g}$  base seca para amostras coletadas no tanque de resfriamento da ESALQ/USP, Piracicaba, SP

<b>Número</b>	<b>Br</b>	<b>Ca</b>	<b>Cs</b>	<b>K</b>	<b>Na</b>	<b>Rb</b>	<b>Zn</b>
<b>01</b>	6,63	8440	0,109	12400	3320	41,0	26,2
	0,31	470	0,008	720	130	3,0	2,1
<b>02</b>	6,92	8610	0,113	12100	3440	42,0	26,4
	0,32	550	0,009	730	130	3,2	2,0
<b>03</b>	6,59	8770	0,105	12500	3390	43,2	25,7
	0,29	510	0,008	750	140	3,3	2,0
<b>04</b>	6,65	8840	0,111	12500	3450	41,0	26,5
	0,31	460	0,008	620	150	3,2	2,0
<b>05</b>	6,52	8940	0,109	11700	3370	41,5	26,7
	0,30	540	0,008	610	140	3,1	2,1
<b>06</b>	6,54	8730	0,108	12100	3340	39,7	25,6
	0,29	400	0,008	750	140	2,8	1,8
<b>07</b>	6,75	8830	0,113	12300	3480	42,3	26,7
	0,31	440	0,008	690	150	3,3	3,1
<b>08</b>	6,69	8690	0,113	12600	3450	41,9	27,2
	0,29	680	0,008	910	140	2,7	2,1
<b>09</b>	6,57	8580	0,108	12000	3350	42,5	26,9
	0,30	520	0,008	820	130	2,6	1,7
<b>10</b>	6,60	8630	0,107	12200	3380	41,3	26,4
	0,29	430	0,007	610	140	3,3	2,6
<b>11</b>	6,47	8690	0,107	12100	3350	40,1	26,0
	0,30	420	0,008	610	130	2,9	2,3
<b>12</b>	6,60	8700	0,109	12300	3420	41,2	26,8
	0,29	510	0,008	590	150	2,8	2,1
<b>13</b>	6,47	8730	0,110	12100	3330	40,5	25,8
	0,30	470	0,008	1200	130	3,0	1,9
<b>14</b>	6,50	8860	0,108	12200	3330	40,2	25,7
	0,30	440	0,008	560	140	3,0	2,0
<b>15</b>	6,53	8750	0,107	12200	3330	40,1	26,2
	0,30	370	0,007	690	140	2,4	2,0
<b>16</b>	6,64	8780	0,108	12300	3390	41,1	27,1
	0,29	470	0,008	540	150	2,8	2,3
<b>Média</b>	<b>6,60</b>	<b>8720</b>	<b>0,110</b>	<b>12200</b>	<b>3380</b>	<b>41,2</b>	<b>26,4</b>
<b>Inc</b>	<b>0,15</b>	<b>240</b>	<b>0,004</b>	<b>370</b>	<b>70</b>	<b>1,5</b>	<b>1,1</b>
<b>DP</b>	<b>0,11</b>	<b>120</b>	<b>0,002</b>	<b>220</b>	<b>20</b>	<b>1,0</b>	<b>0,5</b>
<b>CV</b>	<b>1,7</b>	<b>1,4</b>	<b>2,2</b>	<b>1,8</b>	<b>1,5</b>	<b>2,4</b>	<b>1,9</b>

*Inc = incerteza padrão média (n=16)*

A Figura 4.4 ilustra a homogeneidade do silo de estocagem para Cs, elemento que apresentou o maior coeficiente de variação ( $CV = 2,9\%$ ) para as 10 amostras de 1 L extraídas por uma válvula de escoamento posicionada na porção inferior do reservatório de 22000 L. Todos os 10 resultados individuais estão de acordo com o valor médio, considerando as suas respectivas incertezas expandidas ( $k = 2$ ).

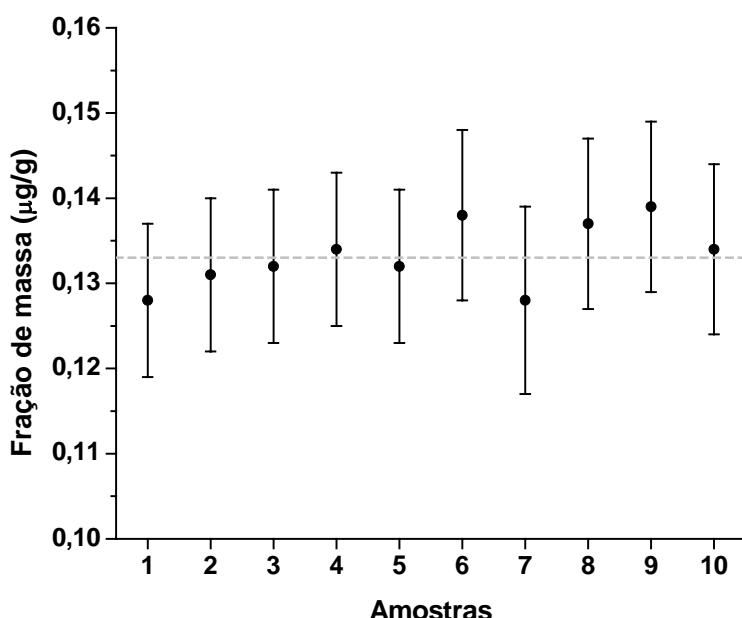


Figura 4.4 Fração de massa e incerteza expandida ( $k = 2$ ) de Cs, expressas em  $\mu\text{g/g}$  em base seca, comparadas com valor médio ( $n = 10$ ) de amostras de 1 L coletadas no silo de estocagem com 22000 L

Segundo Cochran (1977), o tamanho amostral pode ser estimado pela Equação 5:

$$n = \left( \frac{tS}{D} \right)^2 \quad (5)$$

onde:

$n$  = tamanho amostral estimado

$t$  = “ $t$ ” de Student ( $n-1$  graus de liberdade e uma confiança especificada)

$S$  = desvio-padrão

$D$  = desvio permitido pelo analista

A Tabela 4.5 mostra o número mínimo de amostras necessárias para fornecer resultados de confiança ao nível de 95% para os sete elementos químicos determinados. Para o tanque de resfriamento, uma amostra de leite (0,25 L) pode ser considerada representativa do tanque inteiro (1400 L), assumindo desvio máximo de 5 % e nível de confiança de 95 %. Por outro lado, para o silo de estocagem, duas amostras (1 L) seriam necessárias para representar o tanque inteiro (22000 L), assumindo desvio máximo de 5 % e nível de confiança de 95 %.

Tabela 4.5 - Tamanho amostral (*n*) determinado ao nível de confiança de 95 % pela equação de Cochran, admitindo desvio (D) de 10 % e 5 %

<b>Silo de estocagem – Arapuá, MG</b>							
D (%)	Br	Ca	Cs	K	Na	Rb	Zn
10	0,20	0,30	0,40	0,40	0,20	0,20	0,30
5	1,0	1,1	1,7	1,7	0,80	0,90	1,4
<b>Tanque de resfriamento – ESALQ/USP, Piracicaba, SP</b>							
D (%)	Br	Ca	Cs	K	Na	Rb	Zn
10	0,10	0,10	0,20	0,10	0,10	0,30	0,20
5	0,50	0,40	0,90	0,60	0,40	1,0	0,70

*Estes resultados foram publicados no volume 278 (2008) do Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, sob o título “Sampling study in milk storage tanks by INAA” (DOI: 10.1007/s10967-008-0809-1).*

#### **4.3 ESTUDO 1: LEITE ORIUNDO DE TANQUES DE RESFRIAMENTO**

##### Propriedades rurais do estado de Minas Gerais

Os parâmetros da qualidade determinados nas 32 amostras de leite das propriedades rurais de Minas Gerais estão sumarizados na Tabela 4.6.

**Tabela 4.6 - Mínimo (MIN), média (MED), máximo (MAX) e coeficiente de variação (CV) para os parâmetros da qualidade determinados nas amostras de leite das 32 propriedades rurais de Minas Gerais**

	<b>Unidade</b>	<b>MIN</b>	<b>MED</b>	<b>MAX</b>	<b>CV (%)</b>
<b>Gordura</b>	% (m/m)	2,93	3,63	4,60	13
<b>Proteína</b>	% (m/m)	2,97	3,27	3,64	4
<b>Lactose</b>	% (m/m)	4,05	4,43	4,75	4
<b>Sólidos totais</b>	% (m/m)	11,1	12,2	13,4	5
<b>Extrato seco desengordurado</b>	% (m/m)	7,76	8,60	9,05	3
<b>Nitrogênio uréico</b>	mg/dL	5,20	12,1	17,7	24
<b>Contagem de células somáticas</b>	1000/mL	116	643	1817	64
<b>Contagem bacteriana total</b>	UFC/mL*	8	490	2819	162

\*[contagem bacteriana total] – unidades formadoras de colônia por mL

Nota-se a baixa variabilidade da maioria dos parâmetros, exceto para células somáticas e contagem bacteriana total, que são fortemente influenciados pela saúde dos animais e nível sanitário da propriedade. As propriedades rurais foram classificadas em três grupos, levando-se em consideração a contagem de células somáticas e contagem bacteriana total. Quanto maior o número de contagens para esses dois parâmetros, menor o nível tecnológico atribuído à fazenda.

Os elementos químicos Al, Ba, Br, Ca, Co, Cr, Cs, Cu, K, Mn, Na, Ni, Rb, Se, Sr e Zn foram determinados em todas as amostras (Tabela 4.7). Br, Ca, Cs, K, Na, Rb e Zn foram determinados por INAA, enquanto Al, Ba, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Se e Sr foram determinados por ICP-MS.

**Tabela 4.7 -** Valor mínimo (MIN), médio (MED), máximo (MAX) e coeficiente de variação (CV) para os elementos químicos determinados nas amostras de leite das 32 propriedades rurais do estado de Minas Gerais

	<b>MIN</b> (mg/kg*)	<b>MED</b> (mg/kg*)	<b>MAX</b> (mg/kg*)	<b>CV</b> (%)
<b>Al</b>	3,95	5,20	7,48	19
<b>Ba</b>	0,0350	1,75	4,27	60
<b>Br</b>	5,34	8,36	16,3	32
<b>Ca</b>	7710	8878	9950	5
<b>Co</b>	0,0201	0,0246	0,0357	11
<b>Cr</b>	0,239	0,351	0,483	21
<b>Cs</b>	0,0328	0,0629	0,127	33
<b>Cu</b>	0,0150	0,0195	0,0260	12
<b>K</b>	9900	11401	12900	7
<b>Mn</b>	0,107	0,166	0,258	22
<b>Na</b>	2480	3164	4020	12
<b>Ni</b>	0,509	0,735	1,12	23
<b>Rb</b>	11,5	19,5	25,9	20
<b>Se</b>	0,481	0,822	2,12	41
<b>Sr</b>	0,0400	0,0752	0,156	34
<b>Zn</b>	27,0	32,2	38,7	8

\* Valores expressos em base seca

Encontrou-se baixa variabilidade para os elementos químicos essenciais para mamíferos. Os macrominerais Ca, K e Na e os microminerais Zn, Co e Cu têm

funções estruturais, fisiológicas, regulatórias e catalíticas (WHITE; BROADLEY, 2005).

Através de análises estatísticas, verificaram-se diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) para Ba, K, Na e gordura (Tabela 4.8) entre os três diferentes níveis tecnológicos.

**Tabela 4.8 -** Valores médios encontrados para gordura, Ba, K e Na determinados nas amostras de leites oriundos das propriedades rurais do estado de Minas Gerais para os três grupos

Nível tecnológico	Gordura (% - m/m)	Ba (mg/kg*)	K (mg/kg*)	Na (mg/kg*)
<b>Alto</b>	3,53 b	0,58 b	9440 a	2340 b
<b>Médio</b>	3,73 ab	0,44 b	9030 ab	2310 ab
<b>Baixo</b>	4,29 a	0,85 a	8300 b	2810 a

\*Valores expressos em base seca

Médias seguidas por uma letra em comum em cada linha não diferem ao nível de confiança de 95 % pelo teste das comparações múltiplas de Tukey

A fração de massa de Na aumentou nas propriedades rurais de baixo nível tecnológico (Figura 4.5), o que pode ser justificado pela ocorrência de mastite, como consequência das más condições sanitárias, utilização inapropriada dos dispositivos de ordenha e deficiência nutricional. As alterações da composição e das propriedades físico-químicas do leite produzido por uma glândula mamária infectada são atribuídas a três fatores principais: alterações na permeabilidade devido a processos inflamatórios, lesões no epitélio secretor e ação de enzimas originárias de células somáticas e microrganismos (ZAFALON; NADER FILHO, 2007). Dessa forma, o Na, que está presente em grandes concentrações no fluido extracelular, entra nos alvéolos da glândula mamária, aumentando sua concentração no leite. Inversamente, a fração de massa de K diminui nas propriedades classificadas como baixo nível tecnológico. O leite é isosmótico com o plasma do sangue, e, para

manter esse equilíbrio, a variação de Na é compensada pela variação de K (CEBALLO; HERNANDEZ, 2001). A relação Na/K pode, então, ser utilizada para avaliar o nível de sanidade do gado leiteiro.

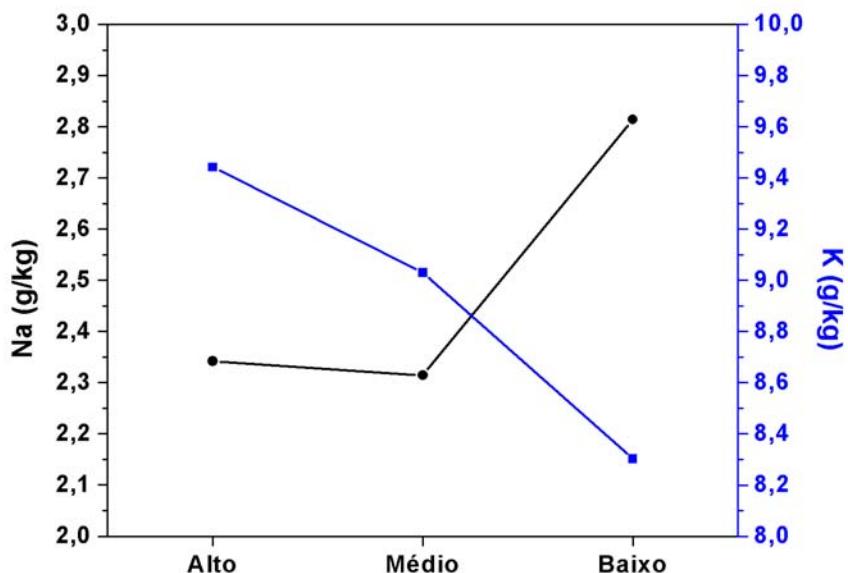


Figura 4.5 Fração de massa média de Na e K em amostras de leite das propriedades rurais de Minas Gerais para os três grupos de níveis tecnológicos

A quantidade de gordura foi menor nas fazendas classificadas com alto nível tecnológico, o que se justifica por sua diluição decorrente da maior quantidade de leite ordenhado. A ocorrência de mastite reduz drasticamente a produção de leite, mas a síntese de gordura não é diminuída proporcionalmente, o que implica em uma maior concentração de gordura no leite (BANSAL et al., 2005).

*Estes resultados serão publicados no Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, sob o título “Chemical composition of bovine milk from Minas Gerais State, Brazil” ainda no ano de 2009 (DOI: 10.1007/s10967-009-0269-2).*

## Propriedades rurais do estado do Rio Grande do Sul

Os elementos químicos Al, Ba, Br, Ca, Co, Cr, Cs, Cu, K, Mn, Na, Ni, Rb, Se, Sr e Zn foram quantificados em todas as amostras. Os valores mínimos (MIN), médios (MED), máximos (MAX) e coeficientes de variação (CV) estão na Tabela 4.9. Da mesma forma como realizado com as amostras oriundas do estado de Minas Gerais, quantificaram-se Br, Ca, Cs, K, Na, Rb e Zn pela INAA e Al, Ba, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Se e Sr pela ICP-MS.

Tabela 4.9 - Valor mínimo (MIN), médio (MED), máximo (MAX) e coeficiente de variação (CV) para os elementos químicos determinados nas amostras de leite das 19 propriedades do estado do Rio Grande do Sul

	MIN (mg/kg*)	MED (mg/kg*)	MAX (mg/kg*)	CV (%)
<b>Al</b>	0,199	1,08	1,94	49
<b>Ba</b>	0,732	1,23	1,95	29
<b>Br</b>	45,5	75,6	110	28
<b>Ca</b>	8204	9687	10561	6
<b>Co</b>	0,0205	0,0237	0,0290	10
<b>Cr</b>	0,132	0,291	0,411	28
<b>Cs</b>	0,0351	0,105	0,179	44
<b>Cu</b>	0,165	0,337	0,550	39
<b>K</b>	10429	12859	15117	11
<b>Mn</b>	0,213	0,550	1,25	50
<b>Na</b>	2673	3439	4331	16
<b>Ni</b>	0,493	0,583	0,656	7
<b>Rb</b>	24,7	46,6	73,6	29
<b>Se</b>	0,422	0,842	1,13	27
<b>Sr</b>	3,02	4,36	6,81	28
<b>Zn</b>	26,2	31,5	38,1	9

\*Valores expressos em base seca

### Comparações: Minas Gerais x Rio Grande do Sul

Através do teste das comparações múltiplas de Tukey, verificaram-se diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) para Al, Br, Ca, Cs, Cu, K, Mn, Ni, Rb e Sr entre as propriedades rurais do estado de Minas Gerais e do estado do Rio Grande do Sul (Tabela 4.10).

Tabela 4.10 - Média da fração de massa e desvio-padrão dos elementos químicos determinados nas amostras dos tanques de resfriamento das propriedades rurais dos estados de Minas Gerais e Rio Grande do Sul. Valores expressos em mg/kg – base seca

	<b>Minas Gerais</b>	<b>Rio Grande do Sul</b>
<b>Al</b>	$5,20 \pm 1,00$ a	$1,08 \pm 0,53$ b
<b>Ba</b>	$1,75 \pm 1,04$ a	$1,23 \pm 0,36$ a
<b>Br</b>	$8,36 \pm 2,64$ b	$75,6 \pm 21,3$ a
<b>Ca</b>	$8878 \pm 463$ b	$9687 \pm 593$ a
<b>Co</b>	$0,0246 \pm 0,0028$ a	$0,0237 \pm 0,0024$ a
<b>Cr</b>	$0,351 \pm 0,074$ a	$0,291 \pm 0,080$ a
<b>Cs</b>	$0,0629 \pm 0,0205$ b	$0,105 \pm 0,047$ a
<b>Cu</b>	$0,0195 \pm 0,0023$ b	$0,337 \pm 0,130$ a
<b>K</b>	$11401 \pm 780$ b	$12859 \pm 1399$ a
<b>Mn</b>	$0,166 \pm 0,036$ b	$0,550 \pm 0,275$ a
<b>Na</b>	$3164 \pm 367$ a	$3439 \pm 552$ a
<b>Ni</b>	$0,735 \pm 0,166$ a	$0,583 \pm 0,041$ b
<b>Rb</b>	$19,5 \pm 4,0$ b	$46,6 \pm 13,7$ a
<b>Se</b>	$0,822 \pm 0,334$ a	$0,842 \pm 0,225$ a
<b>Sr</b>	$0,0752 \pm 0,0252$ b	$4,36 \pm 1,21$ a
<b>Zn</b>	$32,2 \pm 2,7$ a	$31,5 \pm 3,0$ a

Médias seguidas por uma letra em comum em cada linha não diferem ao nível de confiança de 99 % pelo teste das comparações múltiplas de Tukey

Os elementos químicos Br, Ca, Cs, K e Rb quantificados pela INAA para os quais observaram-se diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) entre as amostras oriundas das propriedades rurais do estado de Minas Gerais e do estado do Rio Grande do Sul, corroboram com os resultados de diversos trabalhos científicos desenvolvidos no Laboratório de Radioisótopos. Bacchi et al. (2004) apontaram Br, K e Rb para discriminação de batatas cultivadas sob sistema convencional e orgânico. Santos et al. (2006) citaram Br e Rb para discriminação de feijões cultivados sob sistema convencional e orgânico. Turra et al. (2006) identificaram Br, Cs e Rb para discriminação de laranjas cultivadas sob sistema convencional e orgânico e Ferrari et al. (2008) indicaram Br, Cs, K e Rb para discriminação de tomates cultivados sob sistema convencional e orgânico.

#### **4.4 ESTUDO 2: LEITE ORIUNDO DE ANIMAIS**

Os valores das médias (MED) e coeficiente de variação (CV) para os parâmetros da qualidade das quatro propriedades amostradas no estudo do leite oriundo dos animais estão nas Tabelas 4.11, Tabela 4.12, Tabela 4.13 e Tabela 4.14. Nelas, observa-se que os valores médios determinados estão dentro dos limites estabelecidos pela IN51.

Tabela 4.11 - Valor médio (MED) e coeficiente de variação (CV) para os parâmetros da qualidade determinados nas amostras da propriedade rural “A”

	<b>Unidade</b>	<b>MED</b>	<b>CV (%)</b>
<b>Gordura</b>	% (m/m)	3,06	38
<b>Proteína</b>	% (m/m)	3,35	10
<b>Lactose</b>	% (m/m)	4,65	5
<b>Sólidos totais</b>	% (m/m)	12,0	11
<b>Extrato seco desengordurado</b>	% (m/m)	8,94	4
<b>Nitrogênio uréico</b>	mg/dL	12,8	26
<b>Contagem de células somáticas</b>	1000/mL	399	150
<b>Contagem bacteriana total</b>	UFC/mL*	35	264

\*[contagem bacteriana total] – unidades formadoras de colônia por mL

Tabela 4.12 - Valor médio (MED) e coeficiente de variação (CV) para os parâmetros da qualidade determinados nas amostras da propriedade rural “B”

	<b>Unidade</b>	<b>MED</b>	<b>CV (%)</b>
<b>Gordura</b>	% (m/m)	3,06	25
<b>Proteína</b>	% (m/m)	3,37	12
<b>Lactose</b>	% (m/m)	4,45	6
<b>Sólidos totais</b>	% (m/m)	11,8	10
<b>Extrato seco desengordurado</b>	% (m/m)	8,76	6
<b>Nitrogênio uréico</b>	mg/dL	13,1	29
<b>Contagem de células somáticas</b>	1000/mL	197	125
<b>Contagem bacteriana total</b>	UFC/mL*	81	67

\*[contagem bacteriana total] – unidades formadoras de colônia por mL

Tabela 4.13 - Valor médio (MED) e coeficiente de variação (CV) para os parâmetros da qualidade determinados nas amostras de animais da propriedade rural “C”

	<b>Unidade</b>	<b>MED</b>	<b>CV (%)</b>
<b>Gordura</b>	% (m/m)	4,36	21
<b>Proteína</b>	% (m/m)	3,60	7
<b>Lactose</b>	% (m/m)	4,78	4
<b>Sólidos totais</b>	% (m/m)	13,7	7
<b>Extrato seco desengordurado</b>	% (m/m)	9,38	3
<b>Nitrogênio uréico</b>	mg/dL	11,5	26
<b>Contagem de células somáticas</b>	1000/mL	356	110
<b>Contagem bacteriana total</b>	UFC/mL*	422	130

\*[contagem bacteriana total] – unidades formadoras de colônia por mL

Tabela 4.14 - Valor médio (MED) e coeficiente de variação (CV) para os parâmetros da qualidade determinados nas amostras da propriedade rural “D”

	<b>Unidade</b>	<b>MED</b>	<b>CV (%)</b>
<b>Gordura</b>	% (m/m)	3,30	15
<b>Proteína</b>	% (m/m)	3,03	9
<b>Lactose</b>	% (m/m)	4,48	6
<b>Sólidos totais</b>	% (m/m)	11,6	6
<b>Extrato seco desengordurado</b>	% (m/m)	8,53	4
<b>Nitrogênio uréico</b>	mg/dL	11,6	23
<b>Contagem de células somáticas</b>	1000/mL	115	103
<b>Contagem bacteriana total</b>	UFC/mL*	4,30	178

\*[contagem bacteriana total] – unidades formadoras de colônia por mL

O leite oriundo dos animais da propriedade rural “C” destacou-se pela elevada quantidade de gordura (4,36 g/100g), proteína (3,60 g/100g), lactose (4,78 g/100g), sólidos totais (13,7 g/100g) e extrato seco desengordurado (9,38 g/100g).

A contagem de células somáticas (115 x1000/mL) e contagem bacteriana total (4,30 UFC/mL) destacaram-se nas amostras oriundas da propriedade rural “D”.

As médias das frações de massa e desvios-padrão dos elementos químicos determinados nas amostras das quatro propriedades rurais estão na Tabela 4.15.

**Tabela 4.15 -** Médias das frações de massa e desvios-padrão dos elementos químicos determinados nas amostras de leite dos animais das quatro propriedades rurais do estado de São Paulo. Valores expressos em mg/kg – base seca

	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>
<b>As</b>	0,0554 ± 0,0125 a	0,0429 ± 0,0138 b	0,0391 ± 0,0249 b	0,0194 ± 0,0110 c
<b>Ba</b>	1,45 ± 0,56 a	0,932 ± 0,432 b	0,775 ± 0,401 b	0,380 ± 0,082 c
<b>Ca</b>	6963 ± 931 b	8313 ± 1023 a	6915 ± 901 b	5768 ± 475 c
<b>Co</b>	0,0177 ± 0,0034 a	0,0145 ± 0,0077 a	0,0184 ± 0,0058 a	0,0131 ± 0,0018 a
<b>Cr</b>	0,373 ± 0,065 a	0,282 ± 0,100 b	0,251 ± 0,157 b	0,130 ± 0,084 c
<b>Cs</b>	0,0373 ± 0,0097 c	0,121 ± 0,042 a	0,0622 ± 0,0263 b	0,0702 ± 0,0113 b
<b>Cu</b>	0,557 ± 0,287 a	0,204 ± 0,072 b	0,426 ± 0,232 a	0,242 ± 0,096 b
<b>Mg</b>	710 ± 116 a	608 ± 95 ab	687 ± 248 a	554 ± 97 b
<b>Mn</b>	0,219 ± 0,089 a	0,285 ± 0,088 a	0,345 ± 0,148 a	0,140 ± 0,048 a
<b>Na</b>	3092 ± 918 a	2958 ± 668 ab	2892 ± 1391 ab	2328 ± 543 b
<b>Ni</b>	0,513 ± 0,120 a	0,299 ± 0,107 bc	0,247 ± 0,115 c	0,377 ± 0,098 b
<b>P</b>	5771 ± 829 a	5743 ± 899 a	4594 ± 778 b	5695 ± 400 a
<b>Rb</b>	17,6 ± 6,1 b	28,9 ± 11,9 a	18,3 ± 8,2 b	22,3 ± 4,3 b
<b>Se</b>	0,167 ± 0,049 a	0,112 ± 0,026 b	0,130 ± 0,055 b	0,160 ± 0,027 a
<b>Sr</b>	5,75 ± 1,78 a	3,19 ± 0,89 b	3,36 ± 1,29 b	6,20 ± 0,99 a
<b>Zn</b>	33,1 ± 8,8 a	23,1 ± 6,2 c	31,1 ± 11,0 ab	26,8 ± 6,6 bc

Médias seguidas por uma letra em comum em cada linha não diferem ao nível de confiança de 95 % pelo teste das comparações múltiplas de Tukey

Pelas médias dos 16 elementos químicos determinados, Co e Mn foram os únicos que não apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as quatro propriedades pelo teste das comparações múltiplas de Tukey. Para os demais elementos químicos, foi possível observar que:

- ✓ As maiores médias de As, Cr, Na e Ni foram determinadas nas amostras da propriedade rural “A”
- ✓ As menores médias de As e Na foram determinadas nas amostras da propriedade rural “D”
- ✓ A menor média de P foi determinada nas amostras da propriedade rural “C”
- ✓ A maior média de Rb foi determinada nas amostras da propriedade rural “B”

Os valores dos coeficientes de variação dos elementos químicos que foram quantificados nas amostras das quatro propriedades estão na Tabela 4.16.

**Tabela 4.16 -** Coeficiente de variação (%) dos elementos químicos determinados nas amostras de leite dos animais das quatro propriedades rurais amostradas no estado de São Paulo

	A	B	C	D		A	B	C	D
<b>As</b>	22	57	115	57	<b>Mn</b>	41	67	90	34
<b>Ba</b>	38	79	102	22	<b>Na</b>	30	45	89	23
<b>Ca</b>	13	24	30	8	<b>Ni</b>	23	55	89	26
<b>Co</b>	19	83	72	14	<b>P</b>	14	30	35	7
<b>Cr</b>	17	68	99	65	<b>Rb</b>	35	73	76	19
<b>Cs</b>	26	77	68	16	<b>Se</b>	29	38	70	17
<b>Cu</b>	52	59	119	40	<b>Sr</b>	31	54	62	16
<b>K</b>	24	68	68	67	<b>Zn</b>	27	54	58	25
<b>Mg</b>	16	35	55	18					

Através do dendrograma elaborado pela análise de agrupamento (Figura 4.6) realizada com os resultados das frações de massa das amostras de leite oriundas das quatro propriedades rurais, observou-se que os animais oriundos da propriedade rural “B” se diferiram das demais sob o ponto de vista multivariado. O ocorrido justifica-se pela predominância de animais da raça Jersey, sejam eles puros ou mestiços.

Avaliando-se as propriedades “A”, “C” e “D”, observa-se que houve agrupamento entre os animais da propriedade rural “A” e “C” sob o ponto de vista multivariado. Isso se justifica pelo sistema de produção, visto que os animais da propriedade “D” são criados em sistema de confinamento, diferente do que ocorre com os animais das propriedades “A” e “C”.

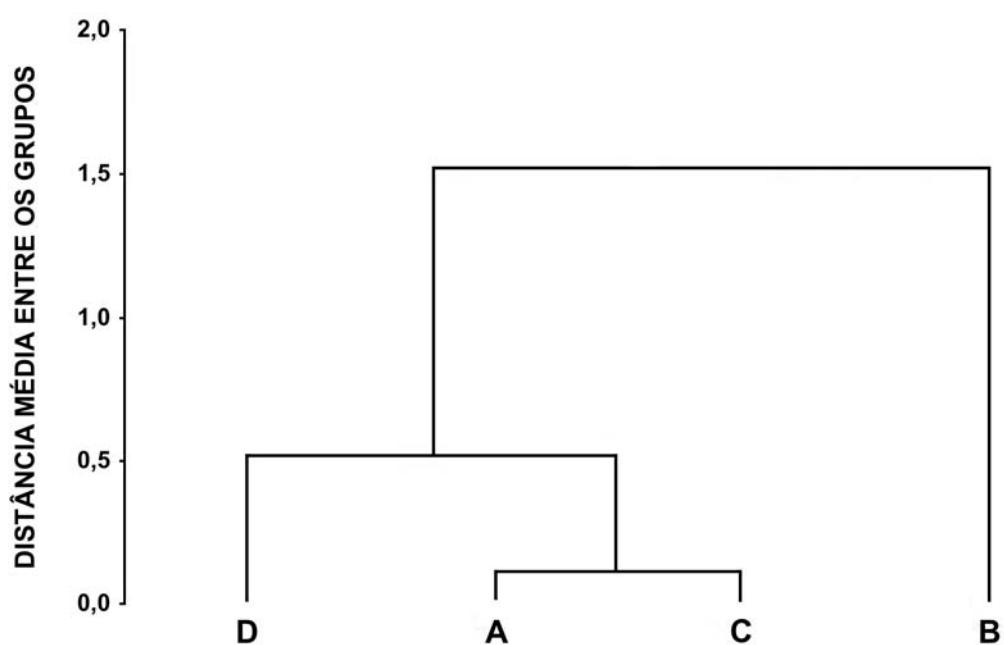


Figura 4.6 Dendrograma resultante da análise de agrupamento elaborado com os valores das frações de massa dos elementos químicos determinados nas amostras de leite oriundas dos animais das quatro propriedades rurais

#### 4.5 RAÇÃO BOVINA

Para os diversos tipos de concentrados e volumosos, determinaram-se os elementos químicos Al, As, Ba, Cd, Ce, Co, Cr, Cs, Cu, La, Mg, Mn, Ni, P, Pb, Rb, Se, Sr e Zn. Com exceção de Al, Mg, Mn, P e Pb, que foram determinados por ICP-MS, As, Ba, Cd, Ce, Co, Cr, Cs, Cu, La, Ni, Rb, Se, Sr e Zn foram determinados pela INAA.

Para esse estudo, verificaram-se duas hipóteses:

- ✓ Primeira hipótese: Se as médias das frações de massa dos elementos químicos determinados nas amostras de concentrado igualam-se às médias das frações de massa dos elementos químicos determinados nas amostras de volumosos de silagem de milho, farelo de arroz e casca de soja
- ✓ Segunda hipótese: Se as médias das frações de massa dos elementos químicos determinados nas amostras de concentrado do estado de Minas Gerais igualam-se às médias das frações de massa dos elementos químicos determinados nas amostras de concentrados do estado do Rio Grande do Sul

A primeira hipótese foi rejeitada. Nesse estudo, verificaram-se diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das frações de massa dos elementos químicos As, Ba, Mg, P, Rb e Sr determinados no concentrado e nos volumosos (Tabela 4.17). O volumoso de farelo de arroz apresentou maior fração de massa dos elementos químicos As, Mg, P e Rb, enquanto Ba e Sr tiveram maiores frações de massa no concentrado e no volumoso de casca de soja, respectivamente.

Tabela 4.17 - Média da fração de massa e desvio-padrão dos elementos químicos determinados no concentrado e nos volumosos de silagem de milho, farelo de arroz e casca de soja. Valores expressos em mg/kg

	Concentrado (n = 19)	Volumoso		
		Silagem de milho (n = 9)	Farelo de arroz (n = 4)	Casca de soja (n = 4)
<b>Al</b>	293 ± 44 a	241 ± 79 a	27,06 ± 0,14 a	371,9 ± 8,4 a
<b>As</b>	0,37 ± 0,07 ab	0,10 ± 0,02 b	0,78 ± 0,01 a	0,27 ± 0,09 ab
<b>Ba</b>	16,7 ± 1,9 b	5,13 ± 0,67 b	4,71 ± 0,01 b	88,1 ± 4,0 a
<b>Cd</b>	0,044 ± 0,006 a	0,019 ± 0,007 a	0,027 ± 0,001 a	0,039 ± 0,0014 a
<b>Ce</b>	0,15 ± 0,50 a	0,042 ± 0,148 a	0,243 ± 0,004 a	0,198 ± 0,0058 a
<b>Co</b>	1,39 ± 0,31 a	0,137 ± 0,021 a	0,247 ± 0,004 a	0,865 ± 0,019 a
<b>Cr</b>	10,7 ± 3,2 a	10,6 ± 1,6 a	6,49 ± 0,33 a	3,29 ± 0,60 a
<b>Cs</b>	2,331 ± 0,025 a	0,689 ± 0,009 a	0,034 ± 0,002 a	0,498 ± 0,0042 a
<b>Cu</b>	32,9 ± 4,2 a	4,94 ± 0,42 a	6,86 ± 0,03 a	10,90 ± 0,98 a
<b>La</b>	1,21 ± 0,27 a	0,471 ± 0,104 a	0,016 ± 0,001 a	0,2790 ± 0,0012 a
<b>Mg</b>	5550 ± 750 ab	1480 ± 60 b	8300 ± 210 a	2660 ± 230 ab
<b>Mn</b>	144 ± 23 a	51 ± 17 a	131,4 ± 2,8 a	47,0 ± 7,2 a
<b>Ni</b>	8,2 ± 2,3 a	6,23 ± 0,99 a	4,39 ± 0,25 a	2,74 ± 0,31 a
<b>P</b>	7200 ± 1500 ab	2270 ± 180 b	22670 ± 670 a	3060 ± 600 b
<b>Pb</b>	0,76 ± 0,10 a	0,213 ± 0,036 a	0,121 ± 0,030 a	0,1875 ± 0,0080 a
<b>Rb</b>	28,3 ± 7,5 b	20,05 ± 0,57 b	106,51 ± 0,72 a	21,7 ± 1,4 b
<b>Se</b>	1,03 ± 0,13 a	0,059 ± 0,011 a	0,120 ± 0,012 a	0,062 ± 0,010 a
<b>Sr</b>	69,2 ± 6,7 a	7,6 ± 1,1 b	3,65 ± 0,03 b	18,33 ± 0,36 ab
<b>Zn</b>	183 ± 33 a	26,8 ± 4,3 a	67,15 ± 0,51 a	61,7 ± 8,2 a

Médias seguidas por uma letra em comum em cada linha não diferem ao nível de confiança de 95 % pelo teste das comparações múltiplas de Tukey

A segunda hipótese também foi rejeitada, visto que os resultados das frações de massa média dos elementos químicos presentes nos concentrados de ambos os estados tiveram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) para As, Cd, Co, Cr, Cs, Ni e Pb (Tabela 4.18). Observa-se também que todos esses elementos químicos tiveram maiores frações de massa nas amostras do estado do Rio Grande do Sul.

Tabela 4.18 - Média da fração de massa e desvio-padrão dos elementos químicos determinados no concentrado do estado de Minas Gerais e do estado do Rio Grande do Sul. Valores expressos em mg/kg

	<b>Minas Gerais (n = 14)</b>	<b>Rio Grande do Sul (n = 5)</b>
<b>Al</b>	$283 \pm 58$ a	$320 \pm 40$ a
<b>As</b>	$0,230 \pm 0,049$ b	$0,75 \pm 0,11$ a
<b>Ba</b>	$16,0 \pm 2,4$ a	$18,9 \pm 1,7$ a
<b>Cd</b>	$0,0334 \pm 0,0036$ b	$0,073 \pm 0,017$ a
<b>Ce</b>	$2,67 \pm 0,58$ a	$1,4 \pm 1,0$ a
<b>Co</b>	$0,87 \pm 0,18$ b	$2,85 \pm 0,77$ a
<b>Cr</b>	$6,02 \pm 0,98$ b	$23,8 \pm 10,2$ a
<b>Cs</b>	$0,114 \pm 0,022$ b	$0,266 \pm 0,047$ a
<b>Cu</b>	$33,0 \pm 5,5$ a	$32,6 \pm 5,0$ a
<b>La</b>	$1,41 \pm 0,31$ a	$0,64 \pm 0,46$ a
<b>Mg</b>	$2460 \pm 780$ a	$5600 \pm 1400$ a
<b>Mn</b>	$122 \pm 27$ a	$206 \pm 36$ a
<b>Ni</b>	$4,85 \pm 0,65$ b	$17,5 \pm 7,7$ a
<b>P</b>	$8500 \pm 1600$ a	$14600 \pm 3200$ a
<b>Pb</b>	$0,72 \pm 0,12$ a	$0,89 \pm 0,19$ a
<b>Rb</b>	$18,3 \pm 6,7$ b	$56,4 \pm 16,8$ a
<b>Se</b>	$0,94 \pm 0,10$ a	$1,28 \pm 0,42$ a
<b>Sr</b>	$75,2 \pm 7,7$ a	$52,4 \pm 11,8$ a
<b>Zn</b>	$168 \pm 39$ a	$225 \pm 65$ a

Médias seguidas por uma letra em comum em cada linha não diferem ao nível de confiança de 95 % pelo teste das comparações múltiplas de Tukey

Com os resultados das frações de massa dos diferentes tipos de alimentos destinados a gado bovino obtidos em ambos os estados, foram observadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre concentrados e volumosos através da análise multivariada da variância (MANOVA). Quando avaliaram-se os três tipos de volumosos (farelo de arroz, casca de soja e silagem de milho), verificou-se pelo dendrograma que a silagem de milho e a casca de soja diferiram do farelo de arroz

sob o ponto de vista multivariado. Contudo, os três tipos de volumosos diferiram do concentrado (Figura 4.7).

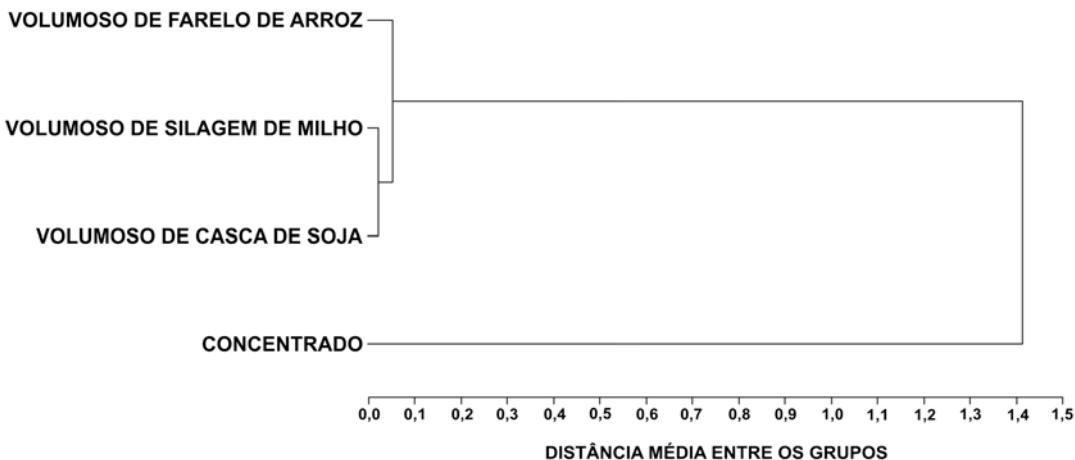


Figura 4.7 Dendrograma elaborado com os diferentes tipos de alimentos destinados a gado bovino

Entre os principais metais tóxicos considerados em alimentos, a fração de massa de As encontrada no volumoso de farelo de arroz (0,78 mg/kg) não excedeu o limite de 1,0 mg/kg estabelecido pela Legislação Brasileira (ANVISA, 1998). Entretanto, esse valor excedeu o limite de 0,5 mg/kg estabelecido pela FAO/IAEA *Training and Reference Center for Food and Pesticide Control* (FAO/IAEA, 1998) e foi 5 vezes superior ao limite de 0,15 mg/kg imposto recentemente pela China (HELLER, 2008).

Os altos níveis de As na alimentação de gado bovino podem ocasionar doenças como a febre catarral maligna (CFM), já detectada no estado do Rio Grande do Sul (RECH et al., 2005). Nessa região, frações de massa de As em farelo de arroz variando de 0,15 mg/kg a 0,58 mg/kg já foram descritas na literatura (FERNANDES et al., 2009).

*Estes resultados serão publicados no Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, sob o título “Chemical analysis of dairy cattle feed from Brazil” ainda no ano de 2009 (DOI: 10.1007/s10967-009-0239-8).*

## 5 CONCLUSÕES

### LEITE COMERCIAL:

- ✓ Os procedimentos de preparo das amostras e da análise por ativação neutrônica instrumental foram empregados com sucesso para a determinação de Br, Ca, Co, Cs, Fe, K, Na, Rb e Zn. Os resultados estão em concordância com a literatura. Ca, K e Zn apresentaram baixa variabilidade (< 10 %) entre as 25 amostras de leite comercial avaliadas, enquanto as maiores variações, verificadas para Br, Cs e Rb, corroboram os resultados de trabalhos científicos desenvolvidos no Laboratório de Radioisótopos (BACCHI et al., 2004; FERNANDES et al., 2004; FERRARI, 2008; FERRARI et al., 2008; SANTOS et al., 2006; TURRA et al., 2006).
- ✓ Foram observadas discrepâncias entre os valores de Ca e Na determinados pela INAA e os valores nutricionais informados pelos fabricantes nas embalagens de leite. Ca mostrou desvios de até 30 % para a maioria das amostras, com uma tendência dos valores medidos serem menores que os informados. Por outro lado, os valores medidos de Na foram maiores que os informados, com variação de até 190 %. Entretanto, tanto o menor valor de Ca quanto o maior valor de Na são fatores de demérito da qualidade do leite.

### REPRESENTATIVIDADE AMOSTRAL:

- ✓ A baixa variabilidade encontrada entre as amostras de leite analisadas para os elementos químicos ( $CV < 2,9\%$ ) demonstra a homogeneidade do leite nos tanques. A variabilidade observada foi explicada pelas incertezas analíticas, por essa razão, nenhum grau de heterogeneidade pode ser atribuído, exceto para K no silo de estocagem de Arapuá, MG. Mesmo assim, no pior caso, duas amostras de 1 L seriam suficientes para representar o silo de estocagem inteiro com um desvio máximo (D) de 5 %. Também foi possível verificar que a amostragem segundo a norma IDF 50 (ISO/DIS 707, 2004) proveu amostras representativas do conteúdo dos tanques para os analitos de interesse.

## ESTUDO 1: LEITE ORIUNDO DE TANQUES DE RESFRIAMENTO

### Propriedades rurais do estado de Minas Gerais:

- ✓ As técnicas analíticas utilizadas permitiram detectar diferenças entre os níveis de qualidade das fazendas leiteiras, principalmente para Na e K. Assim sendo, a razão entre as frações de massa de Na/K podem ser utilizadas para avaliar a saúde do gado leiteiro.

### Propriedades rurais do estado do Rio Grande do Sul:

- ✓ Quantificaram-se Br, Ca, Cs, K, Na, Rb e Zn pela INAA e Al, Ba, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Se e Sr pela ICP-MS.

### Comparações: Minas Gerais x Rio Grande do Sul:

- ✓ Dos 16 elementos químicos quantificados por INAA e ICP-MS, 10 apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) entre as propriedades rurais do estado de Minas Gerais e do estado do Rio Grande do Sul. Desses elementos químicos, Br, Cs, K e Rb já foram mencionados em trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Radioisótopos como importantes para a discriminação de sistema de produção de diversas culturas.

## ESTUDO 2: LEITE ORIUNDO DE ANIMAIS

- ✓ Os valores das médias dos parâmetros da qualidade do leite das quatro propriedades amostradas estão dentro dos limites estabelecidos pela IN51.
- ✓ Para os 16 elementos químicos determinados, Co e Mn foram os únicos para os quais não houve diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as quatro propriedades pelo teste das comparações múltiplas de Tukey.
- ✓ As maiores médias de As, Cr, Na e Ni foram determinadas nos animais oriundos da propriedade rural “A”. Por outro lado, a menor média de Na foi determinada nos animais da propriedade rural “D”.
- ✓ Pela análise de agrupamento, observou-se que os animais da propriedade rural “B” se diferiram dos demais em virtude da grande quantidade de animais da raça Jersey, sejam eles puros ou mestiços. Também observou-se agrupamento entre os animais da propriedade rural “A” e “C” sob o ponto de vista multivariado, visto que os animais da propriedade “D” são criados em sistema de confinamento, diferente do que ocorre com os animais da propriedade “A” e “C”.

### RAÇÃO BOVINA:

- ✓ Com as frações de massa dos elementos químicos determinados, foi possível diferenciar os tipos de alimentos – concentrados e volumosos preparados com farelo de arroz, casca de soja e silagem de milho, além da origem dos alimentos – estado de Minas Gerais e Rio Grande do Sul. Entretanto, o conjunto de elementos químicos que permitiram discriminar as amostras foi diferente para cada situação:
  - O farelo de arroz apresentou maior fração de massa dos elementos químicos As, Mg, P e Rb, enquanto Ba e Sr tiveram maiores frações de massa no concentrado e no volumoso de casca de soja, respectivamente.
  - As amostras do estado do Rio Grande do Sul mostraram maiores frações de massa dos elementos químicos As, Cd, Co, Cr, Cs, Ni e Pb, que apresentaram diferenças significativas entre os dois estados.
- ✓ Os resultados aqui contidos também podem ser úteis em futuras regulamentações governamentais. Como exemplo, citam-se as frações de massa de As nas amostras de volumoso de farelo de arroz e de outros elementos químicos presentes na alimentação do gado bovino no estado do Rio Grande do Sul.

### **CONSIDERAÇÕES FINAIS:**

- ✓ As médias de todos os valores dos parâmetros da qualidade estão dentro dos limites estabelecidos pela Instrução Normativa 51;
- ✓ Dos limites máximos de tolerância (LMT) estabelecidos pela legislação brasileira, somente As e Pb possuem valores específicos para o leite. Desses dois elementos químicos, As foi o único determinado em todas as amostras no estudo com o leite oriundo dos animais. Através das médias dos resultados das quatro propriedades para esse elemento químico, observa-se que nenhum valor excedeu o LMT;
- ✓ Ao considerar todos os elementos químicos estabelecidos pela legislação brasileira, atenção deve ser dada aos elementos químicos Cr e Se por possuírem valores médios superiores aos LMT. Entretanto, há de salientar que os LMT do Decreto nº 55.871 foram estabelecidos em 1965. Observa-se também que os valores médios de Se não ultrapassam a faixa de monitoração de 0,3 – 1 mg/kg estabelecida pela *FAO/IAEA Training and Pesticide Center*,
- ✓ Atenção também deverá ser dada ao farelo de arroz, presente na alimentação do gado como volumoso. A presença de elevadas quantidades desse elemento químico já foi correlacionada a doenças fatais para os animais como a febre catarral maligna.

## REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT. **Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração.** Rio de Janeiro, 2001. (NBR ISO/ABNT 17025).

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Decreto nº 55.871, de 26 de março de 1965. Modifica o Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961, referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto nº 691, de 13 de março de 1962. Brasília, 1965. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/decretos/55871\\_65.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/decretos/55871_65.htm). Acesso em: 30 jun. 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Portaria nº 685, de 27 de agosto de 1998. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 set. 1998. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/685\\_98.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/685_98.htm). Acesso em: 30 jun. 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Rotulagem nutricional obrigatória: leite pasteurizado. Brasília, 2009. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/rotulos/leite/pasteurizado.htm>. Acesso em: 13 jun. 2009.

AKANLE, O. A.; BALOGUN, F. A.; OWA, J. A.; SPYROU, N. M. Variations in trace element concentration in breast milk with stages of lactation, **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Budapest, v. 249, n. 1, p. 71-75, 2001.

ALAEJOS, M. S.; ROMERO, C. D. Selenium concentration in milks. **Food Chemistry**, Barking, v. 52, p. 1-18, 1995.

ALFASSI, Z. B. **Chemical analysis by nuclear methods.** New York: John Wiley & Sons, 1994b. 556 p.

ALFASSI, Z. B. **Determination of trace elements.** Rehovot: Balaban Publishers; VCH, 1994a. 607 p.

ALVIM, R. S. Associativismo x crescimento. **Informe Econômico do Leite**, Juiz de Fora, v.4, p.1, 2003.

BACCHI, M. A.; FERNANDES, E. A. N. Quantu - design and development of a software package dedicated to  $k_0$ -standardized NAA. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Budapest, v. 257, n. 3, p. 577-582, 2003.

BACCHI, M. A.; FERNANDES, E. A. N.; FRANÇA, E. J. A semiempirical approach for the determination of HPGe detector photopeak efficiency aiming at  $k_0$ -INAA. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Budapest, v. 245, p. 209-215, 2000a.

BACCHI, M. A.; FERNANDES, E. A. N.; OLIVEIRA, H. Brazilian experience on  $k_0$  standardized neutron activation analysis. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Budapest, v. 245, p. 217-222, 2000b.

BACCHI, M. A.; FERNANDES, E. A. N.; TSAI, S. M.; SANTOS, L. G. C. Conventional and organic potatoes: Assessment of elemental composition using  $k_0$ -INAA. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Budapest, v. 259, n. 3, p. 421-424, 2004.

BANSAL, B. K.; HAMANN, J.; GRABOWSKI, N. T.; SINGH, K. B. Variation in the composition of selected milk fraction samples from healthy and mastitic quarters, and its significance for mastitis diagnosis. **Journal of Dairy Research**, London, v. 72, p. 144-152, 2005.

BARBOSA, P. F.; PEDROSO, A. F.; NOVO, A. L. M.; RODRIGUES, A.A.; CAMARGO, A. C.; POTT, E. B.; SCHIFFLER, E. A.; AFONSO, E.; OLIVEIRA, M. C. S.; TUPY, O.; BARBOSA, R. T.; LIMA, V. M. B. **Produção de Leite no Sudeste do Brasil**. Vacas mestiças. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2002. (Sistemas de Produção, 4). Disponível em: <http://www.cnpql.embrapa.br/nova/informacoes/sistema/sudeste/racas01.html>. Acesso em: 17 jul. 2009.

BODE, P.; FERNANDES, E. A. N.; GREENBERG, R. R. Metrology for chemical measurements: Purism, pragmatism and the position of INAA. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Budapest, v.245, n.1, p.109-114, 2000.

BORDIN, C.; RAPOSO, F. C.; CALLE, B.; RODRIGUEZ, A. R. Identification and quantification of major bovine milk proteins by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 928, p. 63-76, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo a, do leite tipo b, do leite tipo c, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 20 set. 2002. Seção 1, p. 13. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=8932>. Acesso em: 20 jul. 2009.

BUREAU INTERNATIONAL DES POIDS ET MEASURES - BIPM. Consultative Committee for Amount of Substance: Metrology in Chemistry - CCQM. In: MEETING OF THE COMMITTEE FOR WEIGHTS AND MEASURES, 13., 2007, Sèvres. p. 7-9.

BUREAU INTERNATIONAL DES POIDS ET MEASURES (BIPM). **International Vocabulary of Metrology – basic and general concepts and associated terms – VIM**. 3. ed. Sèvres: JCGM 200, 2008. 90 p.

CANALDOPRODUTOR. Crescem a produção, o consumo e a exportação de leite no país. Brasília, 2008. Disponível em: <http://www.canaldoprodutor.com.br/node/6488>. Acesso em: 13 jul. 2009.

CASSOLI, L. D.; MACHADO, P. F. Manual de instruções para coleta e envio de amostras de leite para análise. Piracicaba: Clínica do Leite, ESALQ/USP, 2007.

Disponível em: [http://www.clinicadoleite.com.br/bibliotecadearquivos\\_n.asp](http://www.clinicadoleite.com.br/bibliotecadearquivos_n.asp). Acesso em: 20 maio 2009.

CEBALLO, P. P.; HERNANDEZ, R. Propriedades físico-químicas do leite e sua associação com transtornos metabólicos e alterações na glândula mamária. In: GONZALEZ, F. H. D. **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001. p. 61-72.

CHEN, Y.; OROSZI, T. L.; MORRIS, M. Salt consumption increases blood pressure and abolishes the light/dark rhythm in angiotensin AT1a receptor deficient mice. **Physiology & Behaviour**, New York, v. 88, p. 95-100, 2006.

CLINICA DO LEITE. **Fazenda. Análises laboratoriais**. Piracicaba, 2009. Disponível em: [http://www.clinicadoleite.com.br/fazenda\\_n.asp](http://www.clinicadoleite.com.br/fazenda_n.asp). Acesso em: 13 jul. 2009.

COCHRAN, W. G. **Sampling techniques**. New York: John Wiley & Sons, 1977.

DE CORTE, F.; SIMONITS, A.; DE WISPELAERE, A.; HOSTE, J. Accuracy and applicability of the  $k_0$ -standardization method. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Budapest, v. 113, p. 145-161, 1987.

DE CORTE, F. The standardization of standardless NAA. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Budapest, v. 248, n. 1, p. 13-20, 2001.

DICTIONARY OF MEASURES, UNITS AND CONVERSIONS. **A brief history of measurement**. London, 2003a. Disponível em: <http://www.cleavebooks.co.uk/dictunit/dictunit2.htm#history>. Acesso em: 2 ago. 2009.

DICTIONARY OF MEASURES, UNITS AND CONVERSIONS. **The System International [SI]**. London, 2003b. Disponível em: <http://www.cleavebooks.co.uk/dictunit/dictunit2.htm#SI>. Acesso em: 2 ago. 2009.

EHMANN, W. D.; VANCE, D. E. **Radiochemistry and nuclear methods of analysis**. New York: John Wiley & Sons, 1991. 531 p.

EUROPEAN COMMISSION. **Metrology in chemistry**. Retieseweg: EC - External Advisory Group - Directorate General for Research Technological Development - EAG DG RTD, 2000. Disponível em: <http://ec.europa.eu/research/fp5/pdf/eag-metrologychemistry-en.pdf>. Acesso em: 3 set. 2009.

FAO/IAEA. Training and Reference Center for Food and Pesticide Control. **Toxic metals**. Vienna, 1998. Disponível em: <http://www.iaea.org/trc/radio-tm.htm>. Acesso em: 30 jun. 2009.

FAO. FAOSTAT. Database: Cow Milk, Whole, Fresh. Production in 2007. Rome, 2009. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/569/DesktopDefault.aspx?PageID=569#ancor>. Acesso em: 23 jun. 2009.

FERNANDES, E. A. N. **Análise por Ativação Neutrônica Instrumental na Metrologia em Química.** 2006. 119 f. Tese (Livre Docência na disciplina Técnicas Analíticas Nucleares) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

FERNANDES, E. A. N.; BACCHI, M. A.; SANTOS, L. G. C.; STEFANUTO, V. A.; SARRIÉS, G. A.; BODE, P. Arsenic in rice and rice bran. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON FOOD AND NUTRITION, 3., 2009, Antalya. **Abstract...** p.118.

FERNANDES, E. A. N.; TAGLIAFERRO, F. S; BACCHI, M. A.; BODE, P.; TURRA, C.; SANTOS, L. G. C. INAA as a tool to identify organically grown food. **Transactions of the American Nuclear Society**, La Grande Park, v. 91, p. 847-848, 2004.

FERNANDES, E. A. N.; BACCHI, M. A.; TAGLIAFERRO, F. S.; GONZAGA, C. L.; FRANÇA, E. J.; FAVARO, P. C.; FOGAÇA, A. A. Quality system implementation in a Brazilian university laboratory. **Accreditation and Quality Assurance**, Heidelberg, v. 10, n. 11, p. 594-598, 2006.

FERRARI, A. A. **Caracterização química de tomates (*Lycopersicon esculentum* Mill.) empregando a análise por ativação neutrônica instrumental.** 2008. 151 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

FERRARI, A. A.; FERNANDES, E. A. N.; TAGLIAFERRO, F. S.; BACCHI, M. A.; MARTINS, T. C. G. Chemical composition of tomato seeds affected by conventional and organic production systems. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Budapest, v. 278, n. 2, 399-402, 2008.

FESKANICH, D.; WILLETT, W. C.; STAMPFER, M. J.; COLDITZ, G. A. Milk, dietary calcium, and bone fractures in women: a 12-year prospective study. **American Journal of Public Health**, Washington, v. 87, p. 992-997, 1997.

FRANÇA, E. J.; FERNANDES, E. A. N.; BACCHI, M. A. Ni-Cr alloy as neutron flux monitor: composition and homogeneity assessment by NAA. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Budapest, v. 257, n. 1, p. 113-115, 2003.

GINÉ-ROSIAS, M. F. Espectrometria de massas com fonte de plasma (ICP-MS). Piracicaba: CENA/USP, 1999. 118 p. (Série Didática, 4).

HALLÉN, I. P.; JORHEM, L.; LAGERKVIST, B. J.; OSKARSSON, A. Lead and cadmium levels in human milk and blood. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 166, p. 149-155, 1995.

HELLER, L. **Rice bran contains high arsenic levels, study.** Montpellier: NUTRA Ingredients.com, 2008. Disponível em: <http://www.nutraingredients-usa.com/Research/Rice-bran-contains-high-arsenic-levels-study>. Acesso em: 30 jun. 2009.

İNAM, R.; SOMER, G. A direct method for the determination of selenium and lead in cow's milk by differential pulse stripping voltammetry. **Food Chemistry**, Barking, v. 69, p. 345-350, 2000.

INGELBRECHT, C.; PEETERMANS, F.; DE CORTE, F.; DE WISPELAERE, A.; VANDECASTEELE, C.; COURTIJN, E.; D'HONDT, P. Aluminium-gold reference material for the  $k_0$ -standardization of neutron activation analysis. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A**, North-Holland, v. 303, n. 1, p. 119-122, 1991.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO. **Sistema Internacional de Unidades – SI**. 8. ed. (revisada). Rio de Janeiro, 2007a. 114 p.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO. **Vocabulário internacional de termos fundamentais e gerais de metrologia**. 4. ed. revisada. Rio de Janeiro, 2007b. 72 p.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO. **Unidades Legais de Medida**. Rio de Janeiro, 2009. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/consumidor/unidLegaisMed.asp>. Acesso em: 3 ago. 2009.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Milk and milk products**: guidance on sampling. Geneva: ISO; Brussels: International Dairy Federation, 2004. (ISO/DIS, 707; IDF, 50).

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Proficiency testing by interlaboratory comparison**. Part 1: Development and operation of proficiency testing schemes. Geneva: ISO, 1997. (ISO/IEC Guide 43-1).

KARMAUS, W.; FUSSMAN, C.; WIJGA, A. H.; BOSHUIZEN, H. C.; SMIT, H. A.; KERKHOF, M.; GERRITSEN, J.; DE JONGSTE, J. C.; NEIJENS, H. J.; BRUNEKREEF, B. Consumption of milk fat and reduced asthma risk in pre-school children. **Thorax**, London, v. 59, p. 725-726, 2004.

KUČERA, J.; FRÁNA, J.; HORÁK, Z.; MAREK, M.; TOMÁŠEK, F.; VIEREIBL, L. Calibration of the reactor neutron spectrum for the  $k_0$ -NAA standardization using several approaches. **Czechoslovak Journal of Physics**, v. 49, n. 7, p. 295–301, 1999.

LAFUNTE, M. A.; BELLOQUE, J.; JUÁREZ, M. Mineral contents and distribution between the soluble and the micellar phases in calcium-enriched UHT milks. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 84, p. 1708-1714, 2004.

LANDSBERGER, S. Compton suppression neutron activation methods in environmental analysis. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Budapest, v. 179, n. 1, p. 67-79, 1994.

LANDSBERGER, S.; WU, D. An evaluation of thermal and epithermal neutron activation analysis Compton suppression methods for biological reference materials. **Biological Trace Element Research**, Berlin, v. 71-72, p. 453-461, 1999.

LANDSBERGER, S.; WU, D. The impact of heavy metals from environmental tobacco smoke on indoor air quality as determined by Compton suppression neutron activation analysis. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 173-174, p. 323-337, 1995.

LANDSBERGER, S.; LARSON, S.; WU, D. Determination of airborne cadmium in environmental tobacco smoke by instrumental neutron activation analysis with a Compton suppression System. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 65, n. 11, p. 1506-1509, 1993.

LICATA, P.; TROMBETTA, D.; CRISTANI, M.; GIOFRÈ, F.; MARTINO, D.; CALÒ, M.; NACCARI, F. Levels of "toxic" and "essential" metals in samples of bovine milk from various dairy farms in Calabria, Italy. **Environment International**, New York, v. 30, p. 1-6, 2004.

LIMA, J. L. F. C.; DELERUE-MATOS, C.; VAZ, M. C. V. F. Automation in iron and cooper determination in milks using FIA system and calorimetric detection. **Food Chemistry**, Barking, v. 62, n. 1, p. 117-121, 1998.

MARTINO, F. A. R.; SANCHÉS, M. L. F.; MEDEL, A. S. The potential of double focusing-ICP-MS for studying elemental distribution patterns in whole milk, skimmed milk and milk whey of different milk. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 442, p. 191-200, 2001.

MARTINO, F. A. R.; SANCHÉS, M. L. F.; MEDEL, A. S. Total determination of essential and toxic elements in milk whey by double focusing ICP-MS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 15, p. 163-168, 2000.

MARTINO, F.A.R.; SANCHÉS, M.L.F.; MEDEL, A.S. Multi-elemental fractionation in milk whey by size exclusion chromatography coupled on line to ICP-MS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 17, p. 1271-1277, 2002.

MARTINS, M. C. Agronegócio do leite. **Informe Econômico do Leite**, Juiz de Fora, v. 3, p. 2, 2003a.

MARTINS, M. C. Leite nos programas institucionais. **Informe Econômico do Leite**, Juiz de Fora, v. 5, p. 4, 2003b.

MAUERHOFER, E. Improvement in the counting statistics and in the limit of detection with Compton suppression spectrometers – a contribution to instrumental neutron activation analysis. **Applied Radiation and Isotopes**, Oxford, v. 47, n. 7, p. 649-658, 1996.

McKINSTRY, P. J.; INDYK, H. E.; KIM, N. D. The determination of major and minor elements in milk and infant formula by slurry nebulisation and inductively coupled

plasma – optical emission spectrometry (ICP-OES). **Food Chemistry**, Barking, v. 65, p. 245-252, 1999.

MILKPOINT. Relatório final. Top100 2009 – Ano base 2008. Piracicaba, 2009. Disponível em: <http://www.milkpoint.com.br/top100/final/> Acesso em: 13 jul. 2009.

NARDI, E. P.; EVANGELISTA, F. S.; TORMEN, L.; SAINT'PIERRE, T. D.; CURTIUS, A. J.; SOUZA, S. S.; BARBOSA JUNIOR, F. The use of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) for the determination of toxic and essential elements in different types of food samples. **Food Chemistry**, Barking, v. 112, n. 3, p. 727-732, 2009.

NÓBREGA, J. A.; GÉLINAS, Y.; KRUSHEVSKA, A.; BARNES, R. M. Direct determination of major and trace elements in milk by inductively coupled plasma atomic emission and mass. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 12, p. 1243-1246, 1997.

OWUSU, W.; WILLETT, W. C.; FESKANICH, D.; ASCHERIO, A.; SPIEGELMAN, D.; COLDITZ, G. A. Calcium intake and the incidence of forearm and hip fractures among men. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 127, p. 1782-1787, 1997.

PARRY, S. J. **Activation spectrometry in chemical analysis**. New York: John Wiley & Sons, 1991. 243 p.

PROHASKA, T.; KÖLLENSPERGER, G.; KRACHLER, M.; DE WINNE, K.; STINGEDER, G.; MOENS, L. Determination of trace elements in human milk by inductively coupled plasma sector field mass spectrometry (ICP-SFMS). **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 15, p. 335-340, 2000.

RECH, R. R.; SCHIELD, A. L.; DRIEMEIER, D.; GARMATZ, S. L.; OLIVEIRA, F. N.; RIET-CORREA, F.; BARROS, C. S. L. Febre catarral maligna em bovinos no Rio Grande do Sul: epidemiologia, sinais clínicos e patologia. **Pesquisas Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 25, p. 97-105, 2005.

RICHTER, W. Comparability and recognition of chemical measurement results - an international goal. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, Berlin, v. 365, p. 569-573, 1999.

RODRIGUEZ RODRIGUEZ, E. M.; DELGADO URETRA, E.; DIAZ ROMERO, C. Concentrations of cadmium and lead in different types of milk. **Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A**, Berlin, v. 208, p. 162-168, 1999.

ROIG, M. J.; ALEGRÍA, A.; BARBERÁ, R.; FARRÉ, R.; LAGARDA, M. J. Calcium bioavailability in human milk, cow milk and infant formulas – comparison between dialysis and solubility methods. **Food Chemistry**, Barking, v. 65, p. 353-357, 1999.

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

SANTOS, L. G. C.; FERNANDES, E. A. N.; BACCHI, M. A.; TAGLIAFERRO, F. S.; TSAI, S. M. Evaluation of conventional and organic beans by instrumental neutron activation analysis. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Budapest, v. 270, n. 1, p. 249-252, 2006.

SATO, K.; KAWASHITA, K. Espectrometria de massa em geologia isotópica. **Geologia USP: Série Científica**, São Paulo, v. 2, p. 57-77, 2002.

SILVA, F. V.; LOPES, G. S.; NÓBREGA, J. A.; SOUZA, G. B. Study of the protein-bound fraction of calcium, iron, magnesium and zinc in bovine milk. **Spectrochimica Acta. Part B**, Oxford, v. 56, p. 1909-1916, 2001.

TEODORO, R. L. **Cruzamento em gado de leite**. 2. ed. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2006. (Instrução Técnica para o Produtor de Leite, 12).

THOMAS, R. A beginner's guide to ICP MS. Part II: The sample-introduction system. **Spectroscopy**, Woodland Hills, v. 16, n. 5, p. 56-60, 2001a.

THOMAS, R. A beginner's guide to ICP MS. Part III: The plasma source. **Spectroscopy**, Woodland Hills, v. 16, n. 6, p. 26-30, 2001b.

THOMAS, R. A beginner's guide to ICP MS. Part IV: The interface region. **Spectroscopy**, Woodland Hills, v. 16, n. 7, p. 26-28, 2001c.

THOMAS, R. A beginner's guide to ICP MS. Part V: The ion focusing system. **Spectroscopy**, Woodland Hills, v. 16, n. 9, p. 38-44, 2001d.

THOMAS, R. A beginner's guide to ICP MS. Part VI: The mass analyzer. **Spectroscopy**, Woodland Hills, v. 16, n. 10, p. 44-48, 2001e.

THOMAS, R. A beginner's guide to ICP MS. Part X: Detectors. **Spectroscopy**, Woodland Hills, v. 17, n. 4, p. 34-39, 2001f.

TIAN, W. Z.; NI, B. F.; WANG, P. S.; CAO, L.; ZHANG, Y. M. Metrological role of neutron activation analysis. IA. Inherent characteristics of relative INAA as a primary ratio method of measurement. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 6, n. 12, p. 488-492, 2001.

TURRA, C.; FERNANDES, E. A. N.; BACCHI, M. A.; TAGLIAFERRO, F. S.; FRANÇA, E. J. Differences between elemental composition of orange juices and leaves from organic and conventional production systems. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Budapest, v. 270, n. 1, p. 203-208, 2006.

ULMAN, C.; GEZER, S.; ANAL, Ö.; TÖRE, R.; KIRCA, Ü. Arsenic in human and cow's milk: A reflection of environmental pollution. **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 101, p. 411-416, 1998.

WEIZHI, T.; BANGFA, N.; PINGSHENG, W.; LEI, C.; YANGMEI, Z. Metrological role of neutron activation analysis. IA. Inherent characteristics of relative INAA as a

primary ratio method of measurement. **Accreditation and Quality Assurance**, Heidelberg, v. 6, n. 12, p. 488-492, 2001.

WHITE, P. J.; BROADLEY, M. R. Biofortifying crops with essential mineral elements **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 10 (2005) 586.

WIELGOSZ, R. J. International comparability of chemical measurement results. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 374, n. 5, p. 767-771, 2002.

WIJGA, A. H.; SMIT, H. A.; KERKHOF, M.; DE JONGSTE, J. C.; GERRITSEN, J.; NEIJENS, H. J.; BOSHUIZEN, H. C.; BRUNEKREEF, B. Association of consumption of products containing milk fat with reduced asthma risk in pre-school children: the PIAMA birth cohort study. **Thorax**, London, v. 58, p. 567-572, 2003.

YONEZAWA, CH.; MATSUE, H.; YUKAWA, M. Non-destructive determination of trace amounts of iodine in biological samples by epithermal neutron activation and Compton suppression gamma-ray spectrometry. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Budapest, v. 255, n. 1, p. 105-109, 2003.

ZAFALON, L. F.; NADER FILHO, A. N. **Características físico-químicas do leite bovino, após o tratamento da mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus* durante a lactação**. São Carlos: Pecuária Sudeste, 2007. 24 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 13).

ZOCCAL, R. **O leite de que o Brasil precisa**. Brasília: Embrapa Sede, 2009a. Disponível em: <http://www.embrapa.br/imprensa/artigos/2009/o-leite-de-que-o-brasil-precisa>. Acesso em: 30 jul. 2009.

ZOCCAL, R. **Evolução da produção de leite nos estados - 1998/2007**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2009b. Disponível em: <http://www.cnpgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0241.php>. Acesso em: 30 jul. 2009.

ZSCHUNKE, A. Metrology in chemistry. - Analytica, Munich, Germany, 12 March 2000. **Accreditation and Quality Assurance**, Heidelberg, v. 6, p. 2, 2001. Editorial.