

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA E AVALIAÇÃO DA
INCIDÊNCIA DE CÁDMIO E CHUMBO EM LEITE HUMANO E
ALIMENTOS INFANTIS**

**ADRIANA QUEIROZ DE OLIVEIRA
Bacharel em Química
Mestre em Ciência de Alimentos**

**Profa. Dra. LÚCIA MARIA VALENTE SOARES
Orientadora**

**Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade
Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Doutor em Ciência de
Alimentos**

**CAMPINAS – SP
2005**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

OL4o Oliveira, Adriana Queiroz de
Otimização de metodologia analítica e avaliação da incidência
de cádmio e chumbo em leite humano e alimentos infantis /
Adriana Queiroz de Oliveira. – Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: Lúcia Maria Valente Soares
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Chumbo. 2. Cádmio. 3. Leite humano. 4. Alimentos
infantis. 5. Espectrometria de absorção atômica. I. Soares,
Lúcia Maria Valente. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Lúcia Maria Valente Soares
(Orientadora)

Profa. Dra. Luciane Mie Kawashima

Profa. Dra. Maria Cecília de Figueiredo Toledo

Profa. Dra. Mônica Cristiane Rojo de Camargo

Prof. Dr. Nivaldo Baccan

Profa. Dra. Solange Cadore

Campinas, de de 2005.

**À minha família,
pelo incentivo e carinho,
dedico.**

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Lúcia M. Valente Soares pela brilhante orientação, dedicação, carinho e pelo amplo aprendizado que me proporcionou.

Aos membros da banca examinadora pelas sugestões apresentadas e atenção dispensada.

Ao CNPq pela bolsa de estudo concedida.

À FAPESP pela concessão de auxílio à pesquisa.

Às todas as mães que aceitaram doar seu precioso leite para a realização deste trabalho.

Às responsáveis pelos bancos de leite humano do Estado de São Paulo que participaram deste trabalho: Cláudia Maria Monteiro Sampaio (Campinas), Maria Nereida Panichi (Bauru), Marilza Domingues da Silva Lorenção (Presidente Prudente), Anália Ribeiro Heck (Ribeirão Preto), Maria José Gardia Mattar (São Paulo) e Maria Alice Guimarães Riva (Votuporanga)

Às amigas Ana Paula, Karla Nery, Silvia Helena, Mônica Cristiane, Pricila Veiga e Luciana Caperuto pelos preciosos momentos de descontração.

À Silvia Amélia (amiga/irmã), Natália e Luciane pela amizade e cumplicidade.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Análise de Alimentos e da Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP pelo carinho e apoio.

À todos que colaboraram para tornar este trabalho uma realidade.

À Deus pela força.

OBRIGADA.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas e Figuras	xi
Resumo Geral	xiii
General Summary	xvi
Introdução Geral	1
Capítulo 1 – Revisão Bibliográfica	4
1.1. Cádmio	5
1.2. Chumbo	8
1.3. A contaminação de leite humano e de alimentos infantis por elementos metálicos, especialmente por cádmio e chumbo	12
1.4. Métodos analíticos para a determinação de cádmio e chumbo	15
1.4.1. Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS) em forno de grafite	16
1.4.2. Análise por ativação de nêutrons	19
1.4.3. Espectrometria de absorção atômica com atomização em chama	21
1.4.4. Espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplada	22
1.4.5. Voltametria de pulso diferencial	24
1.5. Referências bibliográficas	26

Capítulo 2 – Otimização das condições de determinação de cádmio e chumbo em leite humano por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica e levantamento da incidência desses elementos metálicos em leite humano da cidade de Campinas, SP.	35
Resumo	36
2.1. Introdução	37
2.2. Material e métodos	39
2.2.1. Amostras	39
2.2.2. Coleta das amostras	40
2.2.3. Reagentes	41
2.2.4. Equipamento	41
2.2.5. Padrões	42
2.2.6. Modificadores químicos	42
2.2.7. Tensoativos	43
2.2.8. Avaliação da programação do forno de grafite	43
2.2.9. Controle de qualidade analítico	45
2.2.10. Limpeza de vidraria, recipientes plásticos e demais utensílios que entram em contato com a amostra	46
2.3. Resultados e discussão	46
2.3.1. Modificadores químicos	46

2.3.2. Tensoativos	48
2.3.3. Programação do forno de grafite	49
2.3.4. Controle de qualidade analítico	51
2.3.5. Avaliação da presença de cádmio e chumbo em leite humano	53
2.4. Conclusão	55
2.5. Referências bibliográficas	56
Capítulo 3 – Cádmio e chumbo em leite humano do Estado de São Paulo	59
Resumo	60
3.1. Introdução	61
3.2. Material e métodos	65
3.2.1. Amostras	65
3.2.2. Coleta das amostras	65
3.2.3. Reagentes e padrões	66
3.2.4. Modificador químico	67
3.2.5. Tensoativo	67
3.2.6. Equipamento	67
3.2.7. Determinação de cádmio e chumbo	68
3.2.8. Controle de qualidade analítico	69

3.3. Resultados e discussão	70
3.3.1. Controle de qualidade analítico	70
3.3.2. Incidência de cádmio e chumbo em leite humano e cálculo da ingestão provável por lactentes	72
3.4. Conclusão	75
3.5. Referências bibliográficas	76
Capítulo 4 – Avaliação da incidência de cádmio e chumbo em alimentos infantis comercializados na cidade de Campinas, SP.	79
Resumo	80
4.1. Introdução	81
4.2. Material e métodos	84
4.2.1. Amostras	84
4.2.2. Preparo das amostras	84
4.2.3. Preparo de padrões e soluções	85
4.2.4. Equipamento	86
4.2.5. Determinação de cádmio e chumbo	86
4.2.6. Controle de qualidade analítico	87
4.2.7. Material de referência preparado no laboratório	88
4.3. Resultados e discussão	89
4.3.1. Controle de qualidade analítico	89

4.3.2. Incidência de cádmio e chumbo nas amostras	92
4.4. Conclusão	102
4.5. Referências bibliográficas	103
Conclusões gerais	107
Anexos	108

LISTA DE TABELAS e FIGURAS

Capítulo 2 – Otimização das condições de determinação de cádmio e chumbo em leite humano por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica e levantamento da incidência desses elementos metálicos em leite humano da cidade de Campinas, SP.	35
Tabela 2.1.: Amostras de clínicas e hospitais de Campinas	40
Tabela 2.2.: Programação do forno de grafite (recomendada pelo fabricante do equipamento) para cádmio e chumbo	44
Tabela 2.3.: Programação do forno de grafite para a determinação de cádmio e chumbo em amostras (referência doméstica, leite humano e referência certificada)	50
Tabela 2.4.: Resultados do controle de qualidade analítico	52
Tabela 2.5.: Teores de cádmio (Cd) e chumbo (Pb) em amostras de referência certificada (ARC)	53
Figura 2.1.: Gráfico de absorbância versus tempo	54
Capítulo 3 – Cádmio e chumbo em leite humano do Estado de São Paulo	59
Tabela 3.1.: Programação do forno de grafite para a determinação de cádmio e chumbo	68
Tabela 3.2.: Resultados do controle de qualidade analítico	71
Tabela 3.3.: Teores de cádmio (Cd) e chumbo (Pb) em amostras de referência certificada (ARC)	71

Capítulo 4 – Avaliação da incidência de cádmio e chumbo em alimentos infantis comercializados na cidade de Campinas, SP.	79
Tabela 4.1.: Programação do forno de grafite para a determinação de cádmio e chumbo	87
Tabela 4.2.: Resultados do controle de qualidade analítico em purês e cereais	90
Tabela 4.3: Teores de cádmio (Cd) e chumbo (Pb) em amostras de referência certificada (ARC)	90
Tabela 4.4.: Recuperação média (%) de chumbo e cádmio nos purês e cereais infantis	91
Tabela 4.5.:Concentração de cádmio nas formulações a base de soja	92
Tabela 4.6.:Níveis de chumbo (Pb) e cádmio (Cd) em alimentos em forma de purê doce	96
Tabela 4.7.: Níveis de chumbo (Pb) e cádmio (Cd) em alimentos em forma de purê salgado	99
Tabela 4.8.: Níveis de chumbo (Pb) e cádmio (Cd) em cereais infantis	100

RESUMO GERAL

Elementos metálicos, como cádmio e chumbo, uma vez absorvidos pelo organismo, não são completamente eliminados, provocando alterações metabólicas com redução do tempo de vida e da capacidade de trabalho nos indivíduos expostos. Bebês e crianças pequenas constituem a parcela da população que inspira preocupação, do ponto de vista toxicológico, por apresentarem maior absorção que os adultos, em razão de seus organismos não estarem completamente desenvolvidos.

Sabe-se que a maior fonte de exposição ao cádmio e ao chumbo, para indivíduos sem exposição ocupacional e não fumantes, é a dieta. Nos primeiros anos de vida, o ser humano possui uma dieta baseada principalmente no leite materno e em alimentos como formulações lácteas, formulações a base de soja, cereais e alimentos na forma de purê. Por esse motivo, levantamentos da contaminação por cádmio ou chumbo nestes alimentos destinados ao público infantil possuem grande importância.

O presente trabalho visou obter dados sobre a incidência de cádmio e chumbo em leite humano em seis cidades do Estado de São Paulo (Bauru, Campinas, Presidente Prudente, Ribeirão Preto, São Paulo e Votuporanga), em alimentos infantis como formulações lácteas, formulações a base de soja, cereais infantis e alimentos em forma de purê comercializados na cidade de Campinas, SP.

A técnica de análise utilizada foi a espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite. O modificador químico empregado foi $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 4% e o tensoativo Triton[®] X-100 foi utilizado na proporção de 1:1

(amostra: Triton[®] X-100) na concentração de 0,5% (v/v). Solução aquosa de ácido nítrico 0,2% foi utilizada como solvente para todos os reagentes. Os limites de detecção do método foram 0,2 µg/L para cádmio e 0,4 µg/L para chumbo. Após a validação do método, 529 amostras foram analisadas, entre elas 371 de leite humano, 36 de formulações lácteas e 15 formulações a base de soja, 68 de alimentos infantis em forma de purê e 39 de cereais infantis. Foram analisadas três amostras diferentes de todos os alimentos comerciais disponíveis no mercado. As amostras, quando contaminadas, foram analisadas em triplicata e cada replicata analisada em dias diferentes.

Das 371 amostras de leite humano analisadas, 71 eram de doadoras de clínicas e hospitais de Campinas e estas pertenciam a três grupos diferentes de nutrízes: Adolescente (<19 anos) de baixa condição socioeconômica (AdBCS); Adultas (>19 anos) de baixa condição socioeconômica (ABCS) e Adultas de alta condição socioeconômica (AACS). Destas amostras, nenhuma estava contaminada com cádmio e apenas duas apresentaram resíduo de chumbo nas concentrações de 44 e 53 µg/L. Outras 300 amostras de leite humano provenientes de bancos de leite humano das cidades mencionadas anteriormente foram analisadas e dentre essas apenas uma estava contaminada com cádmio (1,5 µg/L) e quatro com chumbo (9,0 a 26 µg/L).

Cinco amostras de formulações a base de soja estavam contaminadas com cádmio em concentrações que variaram de $2,4 \pm 0,3$ a $5,2 \pm 1,3$ µg/L (18 ± 2 a 41 ± 10 µg/kg fórmula seca). Nenhuma das amostras analisadas estava contaminada com chumbo.

Nas amostras de alimento infantil em forma de purê doce, a contaminação por chumbo variou de 10 a 119 $\mu\text{g/kg}$ e para cádmio variou de 5 a 18 $\mu\text{g/kg}$. Entre nos alimentos em forma de purê salgado, os níveis de contaminação foram bastante baixos tanto para cádmio, variando de 7 a 27 $\mu\text{g/kg}$, como para chumbo, variando de 13 a 44 $\mu\text{g/kg}$.

Os cereais infantis analisados apresentaram baixa contaminação tanto por cádmio como por chumbo, mas duas marcas pertencentes ao mesmo fabricante e contendo como ingrediente principal a farinha de arroz, estavam contaminadas com cádmio nos três lotes analisados. Os níveis de contaminação variaram de 17 a 37 $\mu\text{g/kg}$.

Apesar da contaminação por cádmio ou chumbo em algumas amostras de alimentos infantis (formulações a base de leite, formulações a base de soja, purê doce, purê salgado e cereais), estas não colocariam em risco a saúde de bebês e crianças pequenas, pois em quase todas as amostras os níveis de contaminação foram baixos e não atingiriam os níveis tolerados pela OMS (Organização Mundial de Saúde).

GENERAL SUMMARY

Metallic elements, such as cadmium and lead, are not entirely eliminated once absorbed by the body. Cadmium and lead are responsible for undesirable metabolic alterations that cause reduction in life span and work capabilities of exposed individuals. Infants and small children cause the greatest concern due to the fact that their physiological function are not fully developed and thus absorb a higher proportion of these metals than adults.

The most important source of exposure to cadmium and lead for non-smoking individuals without occupational hazards is the diet. During the first years the human being diet is based mostly in the mother's milk and foods such as baby formulas, cereals and purees. It follows that surveys of cadmium and lead in human milk and baby foods acquires the utmost importance.

The present work aimed at acquiring data about the concentrations of cadmium and lead in human milk from the six cities located in the state of São Paulo (Bauru, Campinas, Presidente Prudente, Ribeirão Preto, São Paulo and Votuporanga) and in baby formulas, cereals and purees commercialized in the city of Campinas, SP.

The analytical technique used was atomic absorption spectrometry with eletrothermal atomization. The optimized method used $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 4% as modifier and a tensoactive compound, 0.5% Triton[®] X-100, was mixed with the fluid samples in 1:1 proportion (sample: Triton[®] X-100). All reagents were prepared with 0.2% nitric acid. The detection limits of the optimized method were 0.2 $\mu\text{g/L}$ for cadmium and 0.4 $\mu\text{g/L}$ for lead. A total of 529 samples analyzed were thus divided:

371 human milk, 36 milk formula, 15 soy formula, 68 baby purées, and 39 baby cereal. Three different samples of each commercial food were analyzed. The contaminated samples were analyzed in triplicates and each triplicate in a different day.

Among the human milk samples (371) analyzed, 71 were from donors from hospitals and clinics located at Campinas, SP, and the donors were classified into three groups: Adolescents (< 19 years old) of low socioeconomic condition (AdBCS), Adults (> 19 years old) of low socioeconomic condition (ABCS), Adults of high socioeconomic condition (AACS). Among these samples none was contaminated with cadmium and only two were contaminated with lead with concentrations of 44 and 53 $\mu\text{g/L}$. The others 300 samples were from milk banks from the cities mentioned above. Only one sample was found contaminated with cadmium (1.5 $\mu\text{g/L}$) and four with lead (9.0 – 26 $\mu\text{g/L}$).

Five samples of the soy based formulae were contaminated with cadmium at levels from 2.4 ± 0.3 to 5.2 ± 1.3 $\mu\text{g/L}$ Cd (18 ± 2 to 41 ± 10 $\mu\text{g/kg}$ Cd dry formulae). None of the analyzed samples contained lead.

In the samples of sweet puree, the contamination by lead varied from 10 to 119 $\mu\text{g/kg}$ and for cadmium they varied from 5 to 18 $\mu\text{g/kg}$. Among the samples of salted puree, the levels of contamination were low for cadmium and lead varying from 7 to 17 $\mu\text{g/kg}$ and from 13 to 44 $\mu\text{g/kg}$, respectively.

The baby cereals analyzed showed a low incidence of contamination by cadmium as well as by lead. Two samples from the same company and having rice

flour as the main ingredient were contaminated with cadmium in all three lots analyzed. Contamination levels ranged from 17 to 37 $\mu\text{g/kg}$.

In spite of the contamination found in some samples of baby food (milk based formulae, soy based formulae, sweet puree, salted puree, and cereals) babies and small children would not be at risk due to the low levels of cadmium and lead found, all bellow the tolerance levels advised by WHO (World Health Organization).

INTRODUÇÃO GERAL

Existem cerca de 20 elementos considerados tóxicos para seres humanos, incluindo mercúrio (Hg), cádmio (Cd), chumbo (Pb), arsênio (As), manganês (Mn), tálio (Tl), cromo (Cr), níquel (Ni), selênio (Se), telúrio (Te), antimônio (Sb), berílio (Be), cobalto (Co), molibdênio (Mo), estanho (Sn), tungstênio (W), e vanádio (V). Alguns são essenciais e sua toxicidade depende da quantidade de ingestão. Os 10 primeiros citados são os de maior utilização industrial e têm sido os mais estudados sob o ponto de vista toxicológico. Tais elementos agem com ligantes difusores, com macromoléculas e com ligantes presentes em membranas. Este comportamento provoca sua bioacumulação e biomagnificação na cadeia alimentar, sua persistência no ambiente e distúrbios nos processos metabólicos dos seres vivos. A bioacumulação e a biomagnificação são responsáveis pela transformação de concentrações consideradas normais em concentrações tóxicas para diferentes espécies da biota e também para o ser humano.

As principais fontes antropogênicas de elementos metálicos, como Cd e Pb, no ambiente são fertilizantes, pesticidas, água de irrigação contaminada, queima de biomassa na zona rural, combustão de carvão e óleo, emissões de veículos, incineração de resíduos urbanos e industriais e, principalmente, mineração e fundição.

A variação na ingestão de Cd e Pb, através de alimentos, é resultado de diferentes hábitos alimentares. Quando se avalia a ingestão destes elementos

através da dieta, a exposição ambiental, a exposição ocupacional e o tabagismo devem ser levados em consideração.

Durante a gestação e a lactação, o cádmio e o chumbo podem ser transferidos da mãe para a progênie através da placenta ou do leite. A absorção de chumbo, cádmio e mercúrio, este último sob a forma de metil mercúrio, é maior a partir de dietas líquidas do que através de dietas sólidas. A imaturidade do trato digestivo de bebês e crianças pequenas, por sua vez, promove uma maior absorção destes elementos do que em indivíduos adultos ou crianças mais velhas. O rim imaturo excreta estes elementos com menor eficiência. Assim, uma maior proporção da dose administrada pode se acumular no organismo de crianças menores e bebês, do que em crianças maiores ou adultos. O desenvolvimento incompleto da barreira sanguínea-cerebral também reduz a capacidade do cérebro de crianças pequenas e recém-nascidas em restringir o acúmulo de elementos metálicos. A consequência imediata de tal acúmulo e a possibilidade de que podem perturbar a maturação de tecidos, tais como o sistema nervoso central, levaram a suspeitas fortes que a vulnerabilidade aos efeitos da exposição a elementos metálicos é particularmente alta em estágios iniciais de crescimento e desenvolvimento. A absorção e a retenção de chumbo, cádmio e mercúrio são intensificadas em animais experimentais que recebem dietas líquidas como única fonte de alimento. Este fenômeno ocorre apenas se a dieta total estiver na forma líquida e não é observado quando a alimentação é mista. Estes estudos foram realizados em animais experimentais e ainda não foram adequadamente quantificados. Há, no entanto, fortes motivos para crer que tais efeitos podem colocar em risco a saúde de bebês que recebem leite ou seus substitutos líquidos

em ambientes contaminados com chumbo, cádmio ou mercúrio. Com o aumento dos poluentes ambientais, torna-se necessário conduzir levantamentos sobre a exposição da população ao cádmio e ao chumbo.

O JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) estabeleceu a ingestão semanal tolerável provisória (PTWI) para cádmio como sendo 7 $\mu\text{g/kg}$ de peso corpóreo (p.c.)/ semana e para o chumbo 25 $\mu\text{g/kg}$ de peso corpóreo (p.c.)/ semana, aplicável tanto para adultos como para bebês e crianças.

Levantamentos sobre contaminação por Cd e Pb em leite humano e alimentos destinados a recém nascidos, bebês e crianças pequenas são de grande utilidade por fornecerem informações às agências governamentais ligadas à saúde pública. No Brasil, não existem até o momento dados com relação à incidência destes elementos metálicos em leite materno e em alimentos infantis.

Este trabalho teve como objetivos: (a) validar um método para a determinação de cádmio e chumbo em várias matrizes alimentares destinadas ao público infantil; (b) avaliar a incidência de cádmio e chumbo em leite humano de bancos de leite de algumas cidades do Estado de São Paulo como indicação de exposição das mães aos contaminantes; (c) avaliar a incidência de cádmio e chumbo em alimentos infantis como formulações lácteas, formulações a base de soja, cereais infantis e alimentos em forma de purê; (d) calcular a contribuição na ingestão de cádmio e chumbo por parte do leite materno e dos alimentos infantis consumidos por lactentes e crianças pequenas (até 2 anos).

Capítulo 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Cádmio

O cádmio é um elemento difundido na crosta terrestre onde ocorre em concentrações muito baixas (0,2 mg/kg de crosta terrestre). O cádmio somente começou a ser produzido industrialmente no século XX. Ele é sub-produto da indústria do zinco. Antes da Primeira Guerra Mundial, o cádmio não era recuperado das plantas de zinco ou outras plantas de metais não ferrosos, o que resultou em uma descontrolada contaminação ambiental por décadas. A média anual de produção de cádmio no mundo aumentou de apenas 20 toneladas (t) nos anos 1920 para cerca de 12.000 t no período de 1960-1969, 17.000 t no período de 1970-1984, e desde 1987 flutuam perto de 20.000 t (WHO, 2000).

O metal puro é usado em diversos processos industriais tais como componente de coberturas anticorrosivas, ligas metálicas, pigmentos e estabilizantes e ainda na manufatura de PVC e em baterias. O cádmio ainda pode ser encontrado em fertilizantes para a agricultura a base de fosfato e em esgotos industriais (ANGERER, 1988). As principais formas de exposição ao cádmio são ar, água e alimentos.

O cádmio já foi descrito como um dos elementos traço mais perigosos para o homem (REILLY, 1991). Os riscos para a saúde são maiores quando há inalação desta espécie a partir de fontes ocupacionais e esta resulta diretamente em lesão pulmonar. Assumindo uma inalação diária de 20 m³ de ar e que a concentração é similar em ambientes fechados e abertos, a quantidade média de cádmio inalado por dia por um ser humano na zona rural, urbana ou industrializada não deve exceder 0,01, 0,2 e 0,4 µg, respectivamente. A

deposição do cádmio inalado nos pulmões varia de 10% a 50 % dependendo do tamanho das partículas no ar. A absorção do cádmio nos pulmões também vai depender da natureza química da partícula depositada. O tabagismo pode representar uma fonte adicional de cádmio que pode ser igual ou maior que a da dieta (WHO, 2000).

A água contém concentrações relativamente baixas de cádmio, normalmente entre 0,01 – 1 µg/L. Concentração de até 5 µg/L já foi relatada ocasionalmente e, em raras ocasiões, até 10 µg/L. Em áreas poluídas, a concentração de cádmio pode ultrapassar 25 µg/L (WHO, 2000).

As menores concentrações são encontradas em leite (perto de 1 µg/kg). A concentração de cádmio está na faixa de 1 – 150 µg/kg em carne, peixe e frutas e, na faixa de 10 – 300 µg/kg em alimentos como trigo, arroz e batata. As maiores concentrações (100 – 1000 µg/kg) são encontradas em fígado e rins de mamíferos e em certas espécies de mexilhões, vieiras e ostras. Quando crescem em solo poluído com cádmio, algumas plantas, como o arroz, podem acumular grandes concentrações do metal (maior que 1000 µg/kg). Assim, para os não fumantes, os alimentos constituem a principal fonte ambiental de cádmio (WHO, 2000).

A ingestão diária média através dos alimentos em países europeus e nos Estados Unidos está entre 15 – 25 µg, podendo variar de acordo com a idade e hábitos alimentares. No Japão, a média de ingestão está entre 40 – 50 µg, mas pode ser bem maior em áreas contaminadas (WHO 2000).

Foi demonstrado que 50% dos íons cádmio presente no organismo humano se localizam nos rins, 15% no fígado e 20% nos músculos. O rim é o órgão alvo e

o efeito principal do cádmio é a lesão renal (TAVARES & CARVALHO, 1992). Os efeitos de exposição sub-aguda, através da dieta ou de fontes ambientais, normalmente refletem sobre o rim como efeito de uma alta carga tóxica, e possivelmente também sobre o esqueleto. A retenção de cádmio nos tecidos corpóreos está relacionada com a formação de cádmio-metalotioneína, um complexo de cádmio-proteína de baixo peso molecular (OMS, 1998). Um exemplo do potencial tóxico do cádmio está na doença “Itai-itai”, síndrome observada em mulheres antes e após a Segunda Guerra Mundial no Japão (OMS, 1998). A ingestão de cádmio através dos alimentos e bebidas pode resultar rapidamente em sintomas como náusea, dores abdominais e de cabeça. Diarréia e choque podem ocorrer. Cerca de 15 mg/L de cádmio em um líquido são suficientes para causar tais sintomas. Além dos danos renais, o envenenamento por cádmio pode levar a uma doença nos ossos que os tornam quebradiços, podendo causar colapso do esqueleto. Evidências indicam que a exposição ao cádmio pode resultar em níveis mais elevados de câncer na população que o normal. Efeitos teratogênicos têm sido relatados (REILLY, 1991). Em 1993, a IARC (International Agency for Research on Cancer) classificou o cádmio e seus compostos como grupo 1 de carcinógenos humanos, tendo concluído que existiam evidências suficientes de que o cádmio é cancerígeno para humanos e animais. A evidência da carcinogenicidade em humanos foi baseada principalmente na observação da excessiva mortalidade por câncer no pulmão entre trabalhadores de uma indústria “recuperadora” de cádmio nos Estados Unidos e em indústrias de processamento de cádmio no Reino Unido (WHO, 2000).

Em 1988, o “Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives” (JECFA) estabeleceu a ingestão semanal tolerável provisória (PTWI) para cádmio como sendo 7 µg/ kg de peso corpóreo (p.c.)/ semana, aplicável tanto para adultos como para bebês e crianças. Em adição, o JECFA estimou a ingestão de cádmio, pela dieta, sendo aproximadamente 1 - 4 µg/ kg p.c./ semana e reconheceu que “existe somente uma pequena margem de segurança entre a exposição normal pela dieta e a exposição que produz efeitos deletérios”. Consequentemente, o JECFA recomendou que níveis de cádmio nos alimentos e o total na dieta deveriam ser continuamente monitorados e não poderiam aumentar (GALALGORCHEV, 1993). O mesmo valor de PTWI tem sido mantido até o presente (WHO, 2004)

1.2. Chumbo

No século XVI, Georgius Agricola, em “*De Re Metallica*”, descreveu o chumbo como um metal “mortal e nocivo”. Em 400 a.C., Hipócrates descreveu uma doença a qual chamou de *saturnismo*, com sintomas que iam de cólica a paralisia, que ocorreu em homens que trabalhavam com chumbo (REILLY, 1991).

O chumbo é um elemento poluente comum principalmente devido a sua abundância natural e sua ampla utilização industrial (FALOMIR *et al.*, 1999). A utilização do chumbo pode ser classificada em dois grupos: primeiro como metal e segundo como composto químico. Exemplos da utilização mundial deste elemento

são as baterias de chumbo (acumuladores elétricos para carros), luzes de emergência, tintas e esmaltes para cerâmicas (REILLY, 1991).

A presença de chumbo nos encanamentos de água de casas antigas foi considerada fonte importante de exposição para o homem, particularmente em regiões com “água mole” (pH baixo). Em certas áreas, casas pintadas com tintas contendo chumbo em sua composição poderiam ser uma fonte a mais de exposição, assim como soldas, cerâmicas esmaltadas, cosméticos e medicamentos (WHO, 2000).

As principais fontes de exposição ao chumbo para o homem são o ar, a água e os alimentos. Cerca de 30 – 50 % das partículas inaladas são retidas no sistema respiratório. A concentração de chumbo em água potável e de lençóis freáticos varia de 1 µg/L a 60 µg/L. Esta exposição é considerada baixa quando comparada com a exposição através dos alimentos. Muitos estudos mostraram que a ingestão de chumbo pelo homem através dos alimentos varia entre 100 – 500 µg/dia para um adulto. O principal “passo” onde o chumbo atmosférico entra na cadeia alimentar é através de contaminação foliar das plantas (deposição) (WHO, 2000).

Os sintomas de envenenamento por chumbo compreendem danos aos sistemas hematopoético, nervoso, gastro-intestinal e renal. Os sintomas sub-crônicos incluem a interferência na síntese de hemoglobina. No sistema nervoso central ocorre deterioração acompanhada de comportamento agressivo ou hiperkinético. Condição renal crônica pode resultar de exposição regular e

prolongada em consequência de pequenas, porém freqüentes, ingestões de chumbo (REILLY, 1991).

A encefalopatia causada pelo chumbo pode ocorrer em crianças com alta exposição ao chumbo, provavelmente com níveis sangüíneos de 80 $\mu\text{g/dL}$ ou maiores. Os sintomas iniciais incluem letargia, vômito, irritabilidade, perda de apetite e tontura, progredindo para uma condição denominada ataxia e em um nível reduzido de consciência que pode levar ao coma e à morte. As crianças que se recuperam de uma encefalopatia causada pelo chumbo apresentam com freqüência seqüelas tais como retardamento mental, epilepsia e neuropatia ótica com cegueira em alguns casos (PERLSTEIN & ATALA, 1966). Uma correlação altamente significativa foi relatada entre a presença de chumbo na faixa de 5 – 20 $\mu\text{g/dL}$ de sangue de crianças e a redução na resposta a testes cognitivos. O mais preocupante nestes estudos é o fato de que mesmo em concentrações baixas no sangue, 10 $\mu\text{g/dL}$ Pb, efeitos danosos por parte deste metal são observados (BELLINGER *et al.*, 1986; NEEDLEMAN & GATSONIS, 1990; WINNEKE *et al.*, 1990).

Os efeitos tóxicos do chumbo sobre o rim são de dois tipos: (a) disfunção tubular renal reversível que ocorre principalmente em crianças com exposição aguda ao chumbo e normalmente associada a efeitos no sistema nervoso central, (b) nefropatia intersticial crônica irreversível. A nefropatia crônica causada pelo chumbo é mais comum após períodos prolongados de exposição industrial (GOYER & RHYNE, 1973). A anemia causada pelo envenenamento por chumbo resulta de dois efeitos básicos: ciclo de vida do eritrócito diminuído e prejuízo da

síntese de heme. O ciclo de vida diminuído da hemácia é provavelmente consequência da fragilidade mecânica aumentada da membrana celular (OMS, 1998).

A maior parte do chumbo acumulado no corpo humano está localizada nos ossos (esqueleto), um sítio que permite longa estocagem do chumbo, com tempo de vida médio de 20 anos. Três principais condições fisiológicas podem ocasionar a desmineralização dos ossos: a gestação, a lactação e a osteoporose. Durante a gestação e a lactação a mulher sofre uma perda de mais de 10% do conteúdo dos ossos e pode ocorrer a liberação do chumbo (SALEH *et al.*, 1996). Um organismo com baixos níveis de cálcio e ferro sofre os efeitos tóxicos do chumbo com mais intensidade que um organismo bem nutrido, por permitir uma maior difusão do chumbo através dos tecidos moles do corpo. O chumbo, por sua vez, atravessa a barreira placentária, podendo, portanto, atingir o feto (IDF, 1992; WHO, 2000).

Há indicações particularmente fortes de que bebês e crianças pequenas devam ser considerados grupos de alto risco se a exposição ambiental ao chumbo for excessiva (LIN-FU, 1973). Segundo a WHO (2000), crianças de até 6 anos de idade constituem a população de maior risco de exposição ao chumbo por uma série de motivos. Entre os fatores de exposição estão hábitos comportamentais (levarem à boca mão suja e objetos), ingestão de maior quantidade de água por unidade de peso corpóreo que os adultos e grande prevalência de deficiência de vitamina D a qual aumenta a absorção de chumbo. Os estudos em crianças pequenas, com uma história de exposição constante, mostraram que elas absorvem e retêm substancialmente mais chumbo ingerido do que adultos, cerca de 40 a 50% quando comparado com uma absorção de 10 a 50% nos últimos

(ALEXANDER *et al.*, 1973 e 1974; EPA, 1986). Comparações no metabolismo de chumbo em animais experimentais imaturos e adultos mostram fenômenos idênticos e também indicam diferenças na distribuição de chumbo nos animais jovens, onde a retenção no cérebro é pelo menos 10 vezes maior do que em adultos (WHO, 1977; KOSTIAL, 1983).

Em 1972, o JECFA estabeleceu a ingestão semanal tolerável provisória para chumbo como sendo 50 µg/ kg peso corpóreo/ semana para adultos. Esta foi re-confirmada pelo JECFA em 1978. Em virtude do especial interesse em bebês e crianças, o JECFA mais tarde avaliou o risco à saúde deste segmento da população e a reduziu para 25 µg/ kg peso corpóreo/ semana (GALAL-GORCHEV, 1993). Este valor foi reavaliado em 1999 e é mantido até hoje (WHO, 1999).

1.3. A contaminação do leite humano e de alimentos infantis por elementos metálicos, especialmente por cádmio e chumbo

Compostos metalo-orgânicos e inorgânicos são encontrados na fração aquosa do leite. Em contraste, resíduos de pesticidas estão associados com a fração lipídica do leite humano. Os valores médios para chumbo em leite humano em países industrializados estão entre 5 e 20 µg/L (JENSEN & SLORACH, 1991). No entanto, em regiões com poluição ambiental, valores 20 vezes mais altos podem ser observados. Dados sobre a concentração de cádmio, no entanto, são mais raros e têm indicado uma média inferior a 2 µg/L (JENSEN & SLORACH,

1991). Em 1999, o JECFA produziu um estudo sobre chumbo onde recomenda um limite máximo de 20 µg/kg de chumbo para leite e seus produtos (FAO, 1999).

SALEH *et al.* (1996) investigaram a quantidade de chumbo no leite de mulheres que viviam em 20 regiões diferentes do Egito. As amostras que se mostraram mais contaminadas eram de mulheres que residiam nas cidades de Alexandria, Assiut e Cairo. A concentração média de chumbo foi 49,2 µg/L em Alexandria, 101,4 µg/L em Assiut e 66 µg/L na cidade do Cairo. Os autores atribuíram as altas concentrações de chumbo à utilização de anti-detonante a base de chumbo na gasolina, ao consumo de água contaminada e à inalação de poeira e fumaça de cigarro. Note-se que a gasolina como fonte de chumbo tem desaparecido à medida que os países vêm proibindo seu uso no combustível.

TRIPATHI *et al.* (1999) avaliaram a incidência de cádmio e chumbo em leite humano, em produtos derivados do leite e em alimentos infantis na Índia. Os valores encontrados para cádmio foram bem baixos (0,07- 0,10 µg/L) e a concentração média de chumbo nas amostras de leite bovino foi menor (1,70 µg/L) que a encontrada nas amostras de leite humano (1,90 µg/L). As concentrações encontradas em alimentos infantis variaram entre 39,5 e 77,77 µg/kg para o chumbo e entre 0,45 e 17,7 µg/kg para o cádmio. Os autores ainda estimaram a ingestão diária de Cd e Pb para bebês (de 6 a 12 meses de idade) da cidade de Mumbai (Índia) que consumiam leite e alimentos infantis. Os valores estimados foram 1,1 µg/kg peso corpóreo/dia para chumbo e 0,01 µg/kg peso corpóreo/dia para cádmio.

CONI *et al.* (2000) realizaram um estudo determinando a concentração de elementos traços, entre eles Cd e Pb, em leite maduro de mulheres residindo na cidade de Turim, Itália. Os valores médios encontrados foram 0,8 ng/mL ($\mu\text{g/L}$) e 13 ng/mL ($\mu\text{g/L}$) para cádmio e chumbo, respectivamente. Os valores encontrados são mais altos que os encontrados por TRIPATHI *et al.* (1999) em leite de mulheres da Índia.

Nenhuma correlação foi encontrada entre a ingestão de álcool, fumo, idade materna e número de filhos com o nível de chumbo no leite. Por outro lado, uma correlação significativa foi encontrada entre níveis de chumbo encontrados no sangue de bebês e os níveis encontrados no leite de suas mães (RABINOWITZ *et al.*, 1985).

Um estudo conduzido durante oito anos em países europeus (Polônia, Alemanha e Inglaterra) mostrou que a ingestão de chumbo por bebês e crianças de até 12 anos excedia a ingestão semanal tolerável provisória (PTWI) recomendada pelo JECFA (25 $\mu\text{g/ kg}$ peso corpóreo (p.c.)/semana) na Alemanha (27 $\mu\text{g/ kg}$ p.c./semana) e na Polônia (28 $\mu\text{g/ kg}$ p.c./semana), mas não na Inglaterra (12 $\mu\text{g/ kg}$ p.c./semana). O estudo conclui que a ingestão de chumbo por crianças pequenas e bebês foi devido principalmente à contaminação da água, ao uso de alimentos enlatados com solda contendo chumbo ou residência em áreas industriais (GALAL-GORCHEV, 1993).

No Brasil não existem dados sobre os níveis de cádmio e chumbo em leite humano. Em alimentos infantis, os dados existentes são extremamente escassos. Por outro lado, os níveis de cádmio e chumbo em alimentos consumidos por

adultos, tem sido objeto de estudo (SAKUMA *et al.*, 1989; FÁVARO *et al.*, 1994). Os níveis de chumbo e cádmio foram dosados em 218 amostras de leite *in natura* e pasteurizado, no Vale do Paraíba (SP), em virtude da contaminação ambiental existente naquela área. Quarenta e três amostras apresentaram concentrações de chumbo acima do limite da legislação brasileira que é 0,05 mg/kg (OKADA *et al.*, 1997).

1.4. Métodos analíticos para determinação de cádmio e chumbo

Elementos metálicos, como o cádmio e o chumbo, são encontrados normalmente ao nível de traços. Determinações ao nível de sub $\mu\text{g/mL}$ ou $\mu\text{g/L}$ caem fora dos limites de detecção dos métodos que empregam espectrometria de absorção atômica com atomização em chama (FAAS), de emissão em chama ou mesmo de emissão em plasma induzido (ICP), sem uma etapa de concentração prévia da amostra. A espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS) oferece, no entanto, uma sensibilidade adequada para determinações de elementos metálicos presentes ao nível de traços em amostras biológicas, sem necessidade de uma etapa prévia de concentração (MILLER-IHLI, 1988 e 1989; TAYLOR *et al.*, 1993). Outras técnicas, como ativação de nêutrons (NAA) e fluorescência na faixa de raios-X (XRF), apesar de sensíveis, não chegam a atingir os limites de detecção de ETAA (TAYLOR *et al.*, 2000). A espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplada tem mostrado sensibilidade ao nível de pg/g e abaixo (MURR, 2003-2005) Além disso, a

instrumentação envolvida e sua operação são muito mais dispendiosas que a ETAAS e raras nos laboratórios brasileiros.

1.4.1. Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS) em forno de grafite

A atomização eletrotérmica em forno de grafite exige a otimização de uma série de condições que incluem aquecimento rápido, atomização em plataforma, interrupção do fluxo de gás inerte durante a atomização, um período de resfriamento da plataforma antes da atomização, o emprego de modificadores químicos, o uso de corretor com efeito Zeeman para a absorção não específica e integração da absorbância em relação ao tempo (WELTZ, 1985; ELLEN & VAN LOON, 1990; HASWELL, 1991).

A determinação de elementos metálicos em amostras complexas por espectrometria de absorção atômica (AAS) geralmente requer a destruição da matriz da amostra para a obtenção de uma solução do analito apropriada para a análise. A análise direta da amostra por ETAAS oferece muitas vantagens sobre os procedimentos convencionais de abertura de amostras por via úmida ou seca, tais como, redução do tempo de preparo da amostra, eliminação de possíveis perdas do analito através de volatilização previamente à análise, eliminação de perdas devidas à retenção por resíduos insolúveis e, finalmente, eliminação de contaminação da amostra durante seu preparo (FALOMIR *et al.*, 1999).

A determinação direta em forno de grafite de elementos metálicos em leite, como o cádmio e o chumbo, tem sido relatada por alguns autores (NARRES *et al.*, 1985; FALOMIR *et al.*, 1999). Nestes casos, devido à facilidade de separação das

fases lipídica e aquosa do leite não pasteurizado, o uso de um tensoativo como Triton[®] X-100 tem sido recomendado pelos autores para garantir a homogeneidade da amostra durante sua introdução na plataforma de L'vov. Em leite e alimentos lácteos, o uso de suspensões ("slurries") combinando água oxigenada, ácido nítrico, fosfatos e etanol tem sido relatado (VINAS *et al.*, 1999). Elementos metálicos como cádmio, chumbo e flúor foram determinados em leite e em fórmulas lácteas para bebês por ETAAS após digestão parcial com HNO₃ com adição prévia de ácido cítrico (DABEKA & MCKENZIE *et al.*, 1992).

Entre os modificadores químicos para cádmio e chumbo estão o paládio e misturas deste com nitrato de amônio ou nitrato de magnésio. Estes modificadores foram usados em alimentos e matrizes biológicas diversas (MOREIRA *et al.*, 1995; LIMA *et al.*, 1998). Um melhor desempenho tem sido atribuído à combinações de paládio e nitrato de magnésio (MOREIRA *et al.*, 1995), resultados que coincidem com os de SOARES & MORAES (2003) para cádmio e chumbo em cerveja. Na análise de leite humano, o uso de paládio puro foi relatado por FALOMIR *et al.* (1999).

VIÑAS *et al.* (2000) determinaram Se, Pb e Cd em alimentos infantis em forma de purê por ETAAS. As amostras foram analisadas na forma de suspensões contendo 0,1 % (m/v) de Triton[®] X-100, 1 % (v/v) de ácido nítrico e 30 % (v/v) de peróxido de hidrogênio. As suspensões foram homogeneizadas por 5 minutos. Uma alíquota de 20 µL foi injetada no forno de grafite e o modificador utilizado foi o fosfato de amônio bi-ácido (NH₄H₂PO₄) com diferentes porcentagens de níquel (II). A linearidade das curvas de calibração variou de 0 a 5 ng/mL para

cádmio e de 0 a 60 ng/mL para chumbo. Os limites de detecção obtidos foram 0,4 ng/g para Cd e 3,4 ng/g para Pb. Chumbo não foi encontrado em nenhuma das amostras e os valores de cádmio variaram entre 5 e 10 ng/g.

ROCA de TOGOIRES *et al.* (1999) determinaram Cd e Pb em amostras de cereais infantis por ETAAS. As amostras sofreram digestão por via seca a 450°C por 24 – 48 horas. Uma alíquota de 20 µL foi injetada no forno de grafite sem modificador químico. Os valores de limite de detecção foram 0,33 µg/kg para o Cd e 14,9 µg/kg para o Pb. A linearidade das curvas de calibração para o cádmio foi de 2 – 40 µg/L e para o chumbo 40 – 400 µg/L. A contaminação por chumbo variou nas amostras de 26 a 306 µg/kg e para o cádmio variou de 4 a 36 µg/kg.

COLOGNESI *et al.* (1997) utilizaram um sistema de injeção em fluxo para pré-concentrar Cd e Pb com base na complexação destes elementos com ácido 1,2-dihidroxi-3,5-benzodissulfônico (Tiron®), formando um complexo carregado negativamente, o qual foi retido em uma resina macroporosa trocadora de ânions. A determinação de cádmio e chumbo em água da cidade de Turim, Itália, água de mar e de lago da Antártida foi feita por ETAAS. O limite de detecção obtido para o cádmio foi de 7 ng/L e para o chumbo de 9 ng/L. Os resultados obtidos para amostras de água da cidade de Turim foram de 218 ng/L para o chumbo e de 51 ng/L para o cádmio. Nas amostras provenientes da Antártida foram encontrados 22 ng/L Pb enquanto o cádmio não foi detectado nestas amostras.

LIMA *et al.* (1998) utilizaram ETAAS para determinar chumbo em amostras de bebidas a base de frutas, mel e xaropes (70-75 % açúcar total e 30-25% de umidade). Uma alíquota de 20 µL de amostra foi injetada no forno de grafite

juntamente com o modificador (5 μg de paládio e 3 μg de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$). O limite de detecção obtido foi 7 $\mu\text{g/kg}$ e a linearidade da curva de calibração estendeu-se até 20 $\mu\text{g/L}$. A amostra de suco em pó que se apresentou mais contaminada foi a de manga (69 $\mu\text{g/kg}$) e a menos contaminada foi a de limão (< 7 $\mu\text{g/kg}$). Duas amostras de mel foram analisadas, uma delas estava contaminada com 54 $\mu\text{g/kg}$ e a outra com < 7 $\mu\text{g/kg}$. Já as duas amostras de xarope analisadas apresentaram contaminação de 29 e 45 $\mu\text{g/kg}$.

VIÑAS *et al.* (1999) determinaram Pb e Cu em laticínios. As amostras foram analisadas na forma de suspensões contendo 50% de peróxido de hidrogênio, 1% de ácido nítrico, 0,5% de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e 20% de etanol. Os limites de detecção foram 0,4 $\mu\text{g/L}$ para o Cu e 2,4 $\mu\text{g/L}$ para o Pb. A calibração com padrões aquosos foi utilizada para a quantificação destes elementos nas amostras. O nível de chumbo encontrado nas amostras variou de 9 a 237 $\mu\text{g/kg}$.

1.4.2. Análise por ativação de nêutrons

A técnica analítica de análise por ativação de nêutrons (NAA) é utilizada para a determinação de elementos metálicos ao nível de traços em vários tipos de amostras, entre elas, alimentos. A NAA requer o emprego de um reator nuclear para sua utilização. As amostras (secas e seladas em ampolas de quartzo) são irradiadas com um fluxo de nêutrons térmicos no reator nuclear. Uma parte dos elementos presentes nas amostras é convertida em radioisótopos. O tipo e a energia da radiação e a velocidade de “decaimentos” são características

específicas de identificação. A quantidade da radioatividade induzida é relacionada à quantidade dos elementos presentes nas amostras (REILLY, 1991).

FÁVARO *et al.* (1994) determinaram elementos metálicos como arsênio, cádmio, cromo, cobre, mercúrio, antimônio e selênio em diferentes dietas regionais do Brasil por ativação de nêutrons. Foram analisadas refeições, como almoço e jantar, do restaurante universitário da Universidade de São Paulo, alimentos adquiridos em supermercados e feiras da cidade de Manaus e duas regiões do Estado de Santa Catarina. As amostras analisadas foram irradiadas por 8 horas sob um fluxo de nêutrons térmicos de $10^{13} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Após a irradiação, as amostras passaram por procedimentos diferentes, dependendo dos elementos metálicos que iriam ser determinados. Para a determinação de cádmio, as amostras foram transferidas para frascos Parr para digestão com ácido nítrico. Após a digestão, as amostras foram passadas por coluna de resina trocadora de íons a base de dióxido de magnésio hidratado e submetidas à extração de cádmio na forma de complexos com dietilditiocarbamato. As concentrações médias, em base seca, após 4 determinações, de cádmio foram $< 30 \text{ } \mu\text{g/g}$ para amostras do restaurante universitário, $< 73 \text{ } \mu\text{g/g}$ para amostras da cidade de Manaus, $21 \pm 4 \text{ } \mu\text{g/g}$ para Santa Catarina 1 e $24 \pm 5 \text{ } \mu\text{g/g}$ para Santa Catarina 2. O trabalho avaliou a ingestão diária de todos os elementos metálicos determinados. Para cádmio o valor mais elevado de ingestão diária foi o da cidade de Manaus, $31,5 \text{ } \mu\text{g/dia}$.

GARG *et al.* (1993) realizaram um estudo comparando os níveis de elementos metálicos constituintes e contaminantes em leite humano (colostro),

leite de animais (vaca, búfala e cabra) e leite em pó destinado a crianças e adultos. Todas as amostras foram irradiadas sob fluxo de $10^{12} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Após a irradiação, estas passaram por extração radioquímica. Os valores médios de cádmio em colostro variaram entre 0,40 e 0,50 ng/g. A concentração média de cádmio foi de 0,81 ng/g em leite de vaca, 0,76 ng/g em leite de búfala e de 0,54 ng/g em leite de cabra. Para leite em pó para crianças os valores médios de cádmio foram de 0,61 ng/g e para leite destinado a adultos, 0,62 ng/g.

1.4.3. Espectrometria de absorção atômica com atomização em chama

Os métodos que empregam espectrometria de absorção atômica com atomização em chama apresentam limites de detecção altos e por isso não são indicados para determinações de elementos metálicos ao nível de sub $\mu\text{g/mL}$ ou $\mu\text{g/L}$. Portanto, é necessária uma etapa prévia de concentração dos elementos. Uma das técnicas mais utilizadas para esta etapa de concentração é o sistema de injeção em fluxo com pré-concentração em colunas com resinas trocadoras de íons ou quelantes.

ALEIXO *et al.* (2004) desenvolveram e validaram um método empregando a injeção em fluxo e a espectrometria de absorção atômica com atomização em chama na determinação de cádmio e chumbo em alimentos. As amostras foram analisadas na forma de suspensão a 2% (m/v), preparadas através de extração assistida por ultrassom. Os limites de detecção obtidos foram 0,65 $\mu\text{g/L}$ para o cádmio e 32 $\mu\text{g/L}$ para o chumbo, correspondendo a 0,033 $\mu\text{g/g}$ e 1,6 $\mu\text{g/g}$ de

cádmio e chumbo, respectivamente nas suspensões. A faixa linear se estendeu até 50 µg/L e 1,0 mg/L para cádmio e chumbo, respectivamente.

ENRIQUÉZ-DOMINGUEZ *et al.* (1998) utilizaram um sistema de injeção em fluxo com pré-concentração em resina quelante (ácido poliaminofosfônico) na determinação de cádmio em mexilhões por espectrometria de absorção atômica com atomização em chama. Esta combinação de técnicas resultou em limite de detecção de 0,56 µg/L para 3,4 mL de amostra digerida.

1.4.4. Espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplada

A combinação das técnicas de emissão atômica em plasma induzido (ICP) e espectrometria de massas (MS) tem sido muito utilizada na determinação de elementos metálicos em várias matrizes alimentares e fluidos biológicos.

A técnica de ICP-MS é uma das técnicas mais empregadas na determinação de elementos metálicos presentes em traços, oferecendo uma análise multi-elementar além de excelente sensibilidade e exatidão. A técnica, no entanto, está sujeita a interferências espectrais e não espectrais que não podem ser resolvidas com um quadrupolo de baixa resolução e que levam a valores altos de “background” equivalentes muitas vezes às concentrações de muitos elementos como Fe, Co, As, Cr, Se e V. Isto se torna crucial quando as interferências espectrais variam com mudança de matriz de amostra. O emprego de espectrômetro de massas com setor de campo de alta resolução (HR-ICP-SFMS) permite alta resolução para cada elemento sob investigação e com

separação adequada dos picos de interesse e interferência separados (PROHASKA *et al.*, 2000).

CONI *et al.* (2000) analisaram leite de mulheres residindo na cidade de Turim, Itália, e vizinhança. Estes autores combinaram cromatografia por exclusão e ICP-MS com quadrupolo de alta detecção (Q-ICP-MS) para a especiação de elementos traços em leite humano. A combinação de técnicas possibilitou a obtenção de limites de detecção de 0,02 ng/mL para cádmio e chumbo. Os valores médios encontrados nas 30 amostras analisadas foram 0,8 ng/mL para cádmio e 13 ng/mL para chumbo.

PROHASKA *et al.* (2000) determinaram elementos traços, entre eles Cd e Pb, em leite humano e formulações infantis por HR-ICP-SFMS. Ainda empregaram um nebulizador microconcêntrico em combinação com uma membrana de desolvatação para aumentar o sinal de interesse e diminuir as interferências. Os limites de detecção em leite humano foram 0,07 ng/g e 0,27 ng/g para cádmio e chumbo, respectivamente. Já em leite em pó (formulações infantis), o limite de detecção para cádmio foi 0,33 ng/g e para o chumbo 1,3 ng/g. As amostras analisadas neste trabalho não apresentaram contaminação por cádmio ou chumbo.

HO & JIANG (2002) determinaram Cr, Zn, Cd e Pb em leite em pó. Os autores introduziram a amostra na forma de suspensão e utilizaram vaporização eletrotérmica da amostra, a qual é comumente associada a ICP-MS. A suspensão das amostras possuía em sua concentração final 0,5% (m/v) de ácido ascórbico, 0,5% (v/v) de Triton[®] X-100 e 1% (v/v) de ácido nítrico. A suspensão passou por

uma cela de reação, foi vaporizada eletrotermicamente e a seguir introduzida no ICP-MS. Os limites de detecção obtidos foram 0,2 ng/g e 2 ng/g para cádmio e chumbo, respectivamente.

RIVERO MARTINO *et al.* (2001) empregaram ICP-MS com focagem dupla para investigar como os elementos metálicos, constituintes e contaminantes, se distribuíam em leite humano, em leite bovino UHT, em leite bovino sem tratamento térmico e em formulações lácteas. O limite de detecção do cádmio foi 0,25 µg/L e do chumbo 0,92 µg/L. A amostra de formulação com contaminação mais elevada continha 0,71 µg/L de cádmio e 5,6 µg/L de chumbo. Os autores determinaram ainda elementos metálicos em leite desnatado e soro de leite das mesmas amostras. De acordo com os dados obtidos, o processo de desnatação dos vários tipos de leite diminui a concentração de cádmio e chumbo. O soro de leite proveniente de cada tipo de amostra não apresentou cádmio e/ou chumbo.

1.4.5. Voltametria de pulso diferencial

As técnicas voltamétricas como voltametria de varredura anódica (ASV), voltametria de varredura catódica (CSV), polarografia de pulso diferencial (DPP) e mais recentemente a voltametria de absorção (AV) empregam instrumentação relativamente barata e são capazes de determinar elementos traços e ultra traços com exatidão, além de demonstrar habilidade para determinações multi-elementar (INAM & SOMER, 2000).

QUEIROLO *et al.* (2000) realizaram um trabalho bastante amplo determinando arsênio, cádmio e chumbo em vegetais cultivados nos vales

Andinos do norte do Chile. Esta região foi estudada por possuir forte atividade vulcânica. Cádmio e chumbo foram determinados por voltametria de varredura anódica com pulso diferencial (DPASV) e arsênio foi determinado por ativação de nêutrons. Os resultados demonstraram alta contaminação por Pb (94,4 ng/g) e cádmio (40 ng/g) em casca de batata. Arsênio foi encontrado em altas concentrações em milho (1848 ng/g) e em batata (864 ng/g) na região de Socaire, local de maior produção agrícola da região estudada.

INAM & SOMER (2000) determinaram chumbo e selênio em amostras de leite bovino, por DPASV, provenientes de três cidades (Ankara, Samsun e Izmir) da Turquia. Os níveis médios encontrados para chumbo foram 32,4 µg/L em Ankara, 59,2 µg/L em Samsun e 22,1 µg/L em Izmir. Os autores relatam que o leite da cidade de Samsun foi amostrado em uma fazenda próxima a uma rodovia de grande tráfego, por isso seu valor maior de Pb.

LOCATELLI & TORSI (2003) determinaram Cu, Pb, Cd e Sb em amostras de farinhas de trigo e milho. As amostras foram digeridas com HCl por 3 horas, a 130°C e analisadas por DPASV. Os limites de detecção obtidos foram 0,009 µg/g para o cádmio e 0,032 µg/g para o chumbo. Os valores médios encontrados nas amostras variam de 0,05 a 0,08 µg/g para cádmio e 0,24 a 0,77 µg/g para chumbo.

1.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEIXO, P. C.; SANTOS JÚNIOR, D.; TOMAZELLI, A. C.; RUFINI, I. A.; BERNDT, H.; KRUG, F. J. Cadmium and lead determination in foods by beam injection flame furnace atomic absorption spectrometry after ultrasound-assisted sample preparation. **Analytica Chimica Acta**, v. 512, n. 2, p. 329-337, 2004.

ALEXANDER, F. W.; DELVES, H. T.; CLAITON, B. E. The uptake and excretion by children of lead and other contaminants. In: BARTH, D. (eds.) **Proceedings of an International Symposium**. Luxembourg, Commission of the European Communities, 319-331, 1973.

ALEXANDER, F. W.; CLAITON, B. E.; DELVES, H. T. Mineral and trace metal balances in children receiving normal and synthetic diets. **Quarterly Journal of Medicine**, v. 43, n. 1, p. 89-111, 1974.

ANGERER, J.. Cadmium. In: ANGERER, J.; SCHALLER, K. H. (eds.), **Analysis of hazardous substances in biological materials**, Vol. 2, VCH, Weinheim, 85-96, 1988

BELLINGER, D.; LEBITON, A.; RABINOWITZ, M.; NEEDLEMAN, H.; WATERNAUX, C. Correlates of low-level lead exposure in urban children at 2 years of age. **Pediatrics**, v. 77, n. 6, p. 826-833, 1986.

COLOGNESI, M.; ABOLLINO, O.; ACETO, M.; SARZANINI, C.; MENTASTI, E. Flow injection determination of Pb and Cd traces with graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 44, n. 5, p. 867-875, 1997.

CONI, E.; BOCCA, B.; GALOPPI, B.; ALIMNONTI, A.; CAROLI, S. Identification of chemical species of some trace and minor elements in mature breast milk. **Microchemical Journal**, v. 67, n. 1-3, p. 187-194, 2000.

DABEKA, R. W.; MCKENZIE, A. D. Graphite- furnace atomic absorption spectrometric determination and survey of total aluminum, copper, manganese, molybdenum, and tin in infant formulas and evaporated milks. **Journal of the Association Official of Analytical Chemists International**, v. 75, n. 6, p.954-963, 1992.

ELLEN, G.; VAN LOON, J. W. Determination of cadmium and lead in foods by graphite furnace atomic absorption spectrometry with Zeeman background correction: Test with certified reference materials. **Food Additives and Contaminants**, v. 7, n. 2, p. 265-273, 1990.

ENRÍQUEZ-DOMÍNGUEZ, M. F.; YEBRA-BIURRUM, M. C.; BERMEJO-BARRERA, M. P. Determination of cadmium in mussels by flame atomic absorption spectrometry with preconcentration on a chelating resin in a flow injection system. **The Analyst**, v. 123, n. 1, p. 105-108, 1998.

EPA. Environmental Protection Agency. **Air quality criteria for lead**. Research Triangle Park. Report nº EPA-600/8-83/028cF, 1986.

FALOMIR, P.; ALEGRIA, A.; BARBERÁ, R.; FARRÉ, R. AND LAGARDA, M. J. Direct determination of lead in human milk by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, v. 64, n. 1, p. 111-113, 1999.

FAO. Food and Agriculture Organization. **Draft Maximum Levels for Lead**, Joint FAO/WHO Food Standards Programme, CX/FAC 99/19, 1999.

FÁVARO, D. I. T.; MAIHARA, V. A.; ARMELIN, M. J. A.; VASCONCELLOS, M. B. A.; COZZOLINO, S. M. Determination of As, Cd, Cr, Cu, Hg, Sb, and Se concentrations by radiochemical neutron activation analysis in different Brazilian regional diets. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v.181, n.2, p. 385-394, 1994.

GALAL-GORCHEV, H. Dietary intake, levels in food and estimated intake of lead, cadmium, and mercury. **Food Additives and Contaminants**, v. 10, n. 1, p. 115-128, 1993.

GARG, A. N.; WEGINWAR, R. G.; CHUTKE, N. L. A comparative study of minor and trace elements in human, animal and commercial milk samples by neutron activation analysis. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 172, n. 1, 125-135, 1993.

GOYER, R. A.; RHYNE, B. Pathological effects of lead. **International Review of Experimental Pathology**, 12, p. 1-77, 1973.

HASWELL, S. J (ed). **Atomic absorption spectrometry: Theory, design and applications**. Amsterdam: Elsevier. 1991. 529p.

HO, C-Y.; JIANG, S-J. Determination of Cr, Zn, Cd and Pb in milk powder by slurry sampling electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 17, n. 7, p. 688-692, 2002.

INAM, R.; SOMER, G. A direct method for the determination of selenium and lead in cow's milk by differential pulse stripping voltammetry. **Food Chemistry**, v. 69, n. 3, p. 345-350, 2000.

IDF. International Dairy Federation. Trace elements in milk and milk products. **Bulletin of the International Dairy Federation**, n. 278, p. 31-46, 1992.

JENSEN, A. A.; SLORACH, S. A. **Chemical contaminants in human milk**, Boca Raton: CRC Press. 1991. 298p.

KOSTIAL, K. The absorption of heavy metals by the growing organisms: experimental experience with animals. In: SCHMIDT, E. H. F., HILDEBRANDT, A (eds.) **Health evaluation of heavy metals in infant formula and junior food**. Berlin: Springer-verlag, p. 99-140, 1983.

LIMA, E. C.; KRUG, F. J.; ARRUDA, M. A. Z. Direct determination of lead in sweet fruit-flavored powder drinks by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 53, n. 4, p. 601-611, 1998.

LIN-FU, J. S. Vulnerability of children to lead exposure and toxicity: parts one and two. **New England Journal of Medicine**, v. 289, n. 11, p. 1229-1233, 1973.

LOCATELLI, C.; TORSI, G. Analytical procedures for the simultaneous voltammetric determination of heavy metals in meals. **Microchemical Journal**, v. 75, n. 3, p. 233-240, 2003.

MILLER-IHLI, N. J. Trace element determinations in biological materials using atomic absorption spectrometry. **Journal of Research National Bureau of Standards**, v. 93, n. 6, p. 350-354, 1988.

MILLER-IHLI, N. J. Graphite furnace atomic absorption spectrometry for the analysis of biological materials. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 44, n. 12, p. 1221-1227, 1989.

MOREIRA, M. F. R.; CURTIUS, A. J.; CAMPOS, R. C. Determination of cadmium in whole blood and urine by electrothermal atomic absorption spectrometry using palladium-based modifiers and *in situ* decontamination. **The Analyst**, v. 120, n. 3, p. 947-950, 1995.

MURR (Missouri University Research Reactor Center). **Elements listed by name**. Missouri, 2004.

Disponível em: <http://www.missouri.edu/~murrwww/pages/ac_elemlist.shtml>

Acesso em: 04 maio 2005.

NARRES, H. D.; MOJL, C.; STOEPLER, M. Metal analysis in difficult materials with platform furnace Zeeman – atomic absorption spectroscopy. **Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung**, v. 181, n. 1, p. 111-123, 1985.

NEEDLEMAN, H. L.; GATSONIS, C. A. Low-level lead exposure and the IQ of children. A meta-analysis of modern studies. **Journal of the American Medical Association**, v. 263, n. 5, p. 673-678, 1990.

OKADA, I. A.; SAKUMA, A. M.; MAIO, F. D.; DOVIDAUSKAS, S.; ZENEBON, O.
Avaliação dos níveis de chumbo e cádmio em leite em decorrência de
contaminação ambiental na região do Vale do Paraíba, Sudeste do Brasil.
Revista de Saúde Pública, v. 31, n. 2, p. 140-143, 1997.

OMS. Organização Mundial de Saúde. **Elementos traço na nutrição e saúde
humanas**. São Paulo: Roca, 1998. 297 p.

PERLSTEIN, M. A.; ATTALA, R. Neurologic sequelae of plumbism in children.
Clinical Pediatrics, v. 5, n. 5, p. 292-298, 1966.

PROHASKA, T.; KÖLLENSPERGER, G.; KRACHLER, M.; De WINNIE, 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, v. 15, n. 4, p. 335-340, 2000.

QUEIROLO, F.; STEGEN, S.; RESTOVIC, M.; PAZ, M.; OSTAPCZUK, P.;
SCHWUGER, M. J.; MUÑOZ, L. Total arsenic, lead, and cadmium levels in
vegetables cultivated at the Andean villages of northern Chile. **The Science of
the Total Environment**, v. 255, n. 1-3, p. 75-84, 2000.

RABINOWITZ, M.; LEVITON, A.; NEEDLEMAN, H. Lead in milk and infant blood: a
dose response model. **Archives of Environmental Health**, v. 40, n. 5, p. 283-
286, 1985.

REILLY, C. **Metal contamination of food**. London: Elsevier. 1991. 284 p.

RIVERO MARTINO, F. A.; FERNÁNDEZ SÁNCHEZ, M. L.; SANZ-MEDEL, A. The potential of double focusing-ICP-MS for studying elemental distribution patterns in whole milk, skimmed milk and milk whey of different milks. **Analytica Chimica Acta**, v. 442, n. 2, p. 191-200, 2001.

ROCA de TOGORES, M.; FARRÉ, R.; FRIGOLA, A. M. Cadmium and lead in infant cereals – electrothermal atomic spectroscopic determination. **The Science of the Total Environment**, v. 234, n. 1-3, p. 197-201, 1999.

SALEH, M. A.; RAGAB, A. A.; KAMEL, A.; JONES, J.; EL-SEBAE, K. Regional distribution of lead in human milk from Egypt. **Chemosphere**, v. 32, n. 9, p. 1859-1867, 1996.

SAKUMA, A. M.; SCORSAFAVA, M. A.; ZENEBON, O.; TIGLEA, P.; FUKUMOTO, C. J. Hortaliças comercializadas em São Paulo: Aspectos da contaminação por chumbo, cádmio e zinco. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 49, n. 10, p. 81-84, 1989.

SOARES, L. M. V.; MORAES, A. M. M. Lead and cadmium content of Brazilian beers. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 285-289, 2003.

TAVARES, T. M.; CARVALHO, F. M. Avaliação de exposição de populações humanas a metais pesados no ambiente: exemplos do Recôncavo baiano. **Química Nova**, v. 15, n. 2, p. 147-154, 1992.

TAYLOR, A.; BRANCH, S.; CREWS, H. M.; HALLS, D. J. Atomic spectrometry update-Clinical and biological materials, foods and beverages. **Journal of Analytical Atomic Spectroscopy**, v. 8, n. 3, p. 79R-136R, 1993.

TAYLOR, A.; BRANCH, S.; HALLS, D. J.; OWEN, L. M. W.; WHITE, M. Atomic spectrometry update-Clinical and biological materials, foods and beverages. **Journal of Analytical Atomic Spectroscopy**, v. 15, n. 4, p. 451-487, 2000.

TRIPATHI, R. M.; RAGHNATH, R.; SASTRY, V. N.; KRISHNAMOORTHY, T. M. Daily intake of heavy metals by infant's milk and milk products. **The Science of the Total Environment**, v. 227, n. 2-3, p. 229-235, 1999.

VIÑAS, R.; PARDO-MARTÍNEZ, M.; CAMPINLLO, N.; HERNANDEZ-CORDOBA, M. Fast determination of lead and copper in dairy products by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Journal of the Association Official of Analytical Chemists**, v. 82, n. 2, p. 368-373, 1999.

VIÑAS, P.; PRADO-MARTÍNEZ, M.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA. Rapid determination of selenium, lead and cadmium in baby food samples using electrothermal atomic absorption spectrometry and slurry atomization. **Analytical Chimica Acta**, v. 412, n. 1-2, p. 121-130, 2000.

WELZ, B. **Atomic absorption spectrometry**. Weinheim: VCH. 1985. 506p.

WINNEKE, G.; BROCKHAUS, A.; EWERS, U.; KRAMER, U.; NEUF, M. Results from the European multicenter study on lead neurotoxicity in children: Implications for risk assessment. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 12, n. 6, p. 553-559, 1990.

WHO. World Health Organization. **Lead**. Environmental Health Criteria 3. Geneva, 1977.

WHO. World Health Organization. **Summary and conclusions**. Fifty-third meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Rome, Italy, 1999. 21p.

Disponível em:

<http://www.who.int/ipcs/food/jecfa/summaries/en/summary_53.pdf>. Acesso em: 10 abr. 2005.

WHO. World Health Organization. **Air Quality Guidelines**. 2nd edition. Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark, 2000. Disponível em:

<http://www.euro.who.int/document/aiq/6_3cadmium.pdf>.

<http://www.euro.who.int/document/aiq/6_7lead.pdf>. Acesso em: 10 set. 2004.

WHO. World Health Organization. **Safety evaluation of certain food additives and contaminants**. Sixty-first meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Geneva, 2004. 563 p. Disponível em: <<http://www.whqlibdoc.who.int/publications/2004/924166052X.pdf>>. Acesso em: 31 mar. 2005

Capítulo 2

OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE DETERMINAÇÃO DE CÁDMIO E CHUMBO EM LEITE HUMANO POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM ATOMIZAÇÃO ELETROTÉRMICA E LEVANTAMENTO DA INCIDÊNCIA DESSES ELEMENTOS METÁLICOS EM LEITE HUMANO DA CIDADE DE CAMPINAS, SP.

RESUMO

Para a determinação de chumbo e cádmio em leite humano por espectrometria de absorção com atomização eletrotérmica em forno de grafite foram estudadas as seguintes variáveis: tipo de modificador químico, proporção e concentração do tensoativo Triton[®] X-100 e programação de temperatura do forno de grafite. Maior sensibilidade foi obtida com o modificador $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 4% e o tensoativo Triton[®] X-100 na proporção de 1:1 (amostra:Triton[®] X-100) na concentração de 0,5% (v/v). Nestas condições e com a programação de temperatura otimizada, os limites de detecção foram 0,2 $\mu\text{g/L}$ para cádmio e 0,4 $\mu\text{g/L}$ para chumbo, a recuperação foi de 102% para o chumbo e 94% para o cádmio e a repetibilidade foi de 10% e 13% para o chumbo e para o cádmio, respectivamente. Setenta e uma amostras de leite humano, provenientes de doadoras da cidade de Campinas, SP, foram analisadas. Destas amostras, nenhuma estava contaminada com cádmio e apenas duas estavam contaminadas com chumbo, nas concentrações de 44 ± 5 e 53 ± 4 $\mu\text{g/L}$.

2.1. INTRODUÇÃO

Elementos metálicos, como o cádmio e o chumbo, uma vez absorvidos pelo organismo, não são completamente eliminados, provocando alterações metabólicas com redução de tempo de vida e de capacidade de trabalho nos indivíduos expostos.

A variação na ingestão de contaminantes através de alimentos é resultado de diferentes hábitos alimentares e de vários tipos de exposição ambiental. O tabagismo e o ar urbano aumentam a exposição ao chumbo e ao cádmio e este fato deve ser levado em consideração quando se avalia a ingestão destes elementos através da alimentação (PATRIARCA *et al.*, 2000; LOUEKARI *et al.*, 1989).

Durante a gestação e a lactação, o cádmio e o chumbo podem ser transferidos da mãe para a progênie através da placenta ou do leite. O leite humano, por sua vez, reveste-se de importância crucial por servir de alimento a recém-nascidos (OMS, 1998).

O cádmio e o chumbo são encontrados normalmente em traços. Determinações ao nível de sub $\mu\text{g/mL}$ ou $\mu\text{g/L}$ ficam fora dos limites de detecção dos métodos que empregam espectrometria de absorção atômica com atomização em chama, emissão em chama ou mesmo emissão em plasma induzido, sem uma etapa de concentração prévia da amostra. A espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS) oferece, no entanto, uma sensibilidade adequada para determinações de elementos metálicos presentes em baixas concentrações em amostras biológicas, sem necessidade de uma etapa prévia de

concentração (MILLER-IHLI, 1988 e 1989; TAYLOR *et al.*, 1993). Além disso, a instrumentação envolvida em ETAAS é menos dispendiosa e mais comum laboratórios nos brasileiros que outras técnicas como emissão em plasma induzido acoplado a espectrometria de massas (ICP-MS), ativação de nêutrons (NAA) e fluorescência de raios-X (XRF) (TAYLOR *et al.*, 2000).

Em amostras complexas, como alimentos, a determinação de elementos metálicos por espectrometria de absorção atômica (AAS) normalmente requer uma etapa prévia de destruição da matriz da amostra para a obtenção de uma solução do analito apropriada para a análise. A ETAAS oferece vantagens como a análise direta da amostra, a redução no tempo de preparado da amostra, a não volatilização do analito previamente à análise, a não retenção por resíduos insolúveis e a eliminação do risco de possível contaminação da amostra durante seu preparo (FALOMIR *et al.*, 1999).

FALOMIR *et al.* (1999) e VINAS *et al.* (1999) realizaram análise direta de elementos metálicos por ETAAS em leite (humano e bovino) e produtos lácteos. Na análise de leite, devido à facilidade de separação das fases lipídica e aquosa do leite não pasteurizado, o uso de um tensoativo como Triton[®] X-100 é recomendado para garantir a homogeneidade da amostra durante sua introdução na plataforma de L'vov. O uso de suspensões ("slurries") combinando água-oxigenada-ácido nítrico-fosfatos-etanol têm sido utilizadas na determinação de cádmio e chumbo em leite e em alguns alimentos (VINAS *et al.*, 1999). Outros elementos metálicos foram determinados em leite e fórmulas lácteas para bebês

por ETAAS após digestão parcial com HNO_3 com adição prévia de ácido cítrico (DABEKA & MCKENZIE, 1992).

Entre os modificadores químicos para cádmio e chumbo estão o paládio e misturas deste com nitrato de amônio ou nitrato de magnésio. Um melhor desempenho tem sido atribuído às combinações de paládio e nitrato de magnésio (MOREIRA *et al.*, 1995), resultados coincidem com os de SOARES & MORAES (2003) para cádmio e chumbo em cerveja. Na análise de leite humano, o uso de paládio puro foi relatado por FALOMIR e colaboradores (1999). O modificador mais popular e considerado quase que universal em ETAAS é o fosfato de amônio monobásico ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) por ajudar a remover haletos e por estabilizar elementos como o cádmio e o chumbo (SCHLEMMER & RADZIUK, 1999).

Os objetivos do presente trabalho foram otimizar um método para a determinação de cádmio e chumbo em leite humano e avaliar a incidência de cádmio e chumbo em leite humano de doadoras de clínicas e hospitais da cidade de Campinas, SP.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Amostras

As amostras utilizadas foram obtidas através de hospitais e clínicas da cidade de Campinas, SP, com permissão das nutrizes.

Participaram do estudo 71 nutrizes primíparas com idade entre 14 e 39 anos com pelo menos 30 dias de lactação e no máximo 90 dias, em regime de aleitamento materno exclusivo e que preencheram os seguintes critérios: ausência

de intercorrências importantes durante a gestação, parto e puerpério; período gestacional entre 38 e 42 semanas; gestação com conceito único; peso do recém nascido superior a 2500g; não fumante; sem uso de medicamentos e suplementos vitamínicos e eutrófica de acordo com o Índice de Massa Corporal ($>19 \text{ Kg /m}^2$).

As nutrízes foram classificadas em três grupos: Adolescentes (<19 anos) de baixa condição socioeconômica (AdBCS); Adultas (>19 anos) de baixa condição socioeconômica; (ABCS) Adultas de alta condição socioeconômica (AACS). Foram consideradas como de baixa condição socioeconômica (BCS), as mães selecionadas em instituições públicas que atendem a população carente e de alta condição socioeconômica (ACS), aquelas recrutadas em instituições particulares.

Tabela 2.1: Amostras de clínicas e hospitais da cidade de Campinas.

População	Número de amostras
Nutriz adulta de alta condição socioeconômica (AACS)	18
Nutriz adulta de baixa condição socioeconômica (ABCS)	24
Nutriz adolescente de baixa condição socioeconômica (AdBCS)	29

2.2.2. Coleta das amostras

As amostras de leite maduro (30 dias a três meses pós-parto) foram coletadas por expressão manual de ambas as mamas, em diversos momentos, no período da tarde para evitar variações promovidas pelo período do dia, obtendo-se

assim um *pool* de leite com volume aproximado de 15 a 20 mL. A coleta foi feita diretamente em frascos de polipropileno com tampa de rosca, previamente lavados e imersos por 24 horas em detergente Extran[®] neutro, enxaguados com água deionizada e colocados em solução de ácido nítrico 10% por 24 horas. Após esse período, foram enxaguados repetidas vezes com água deionizada e secos em estufa a 40°C. As amostras foram conservadas a -20°C até o momento das análises.

2.2.3. Reagentes

Padrão de Cádmio (grau absorção atômica, Carlo Erba), padrão de Chumbo (grau absorção atômica, Carlo Erba), ácido nítrico 65% (Suprapur, Merck), ácido clorídrico 37% (Merck), Triton[®] X-100 (J.T. Baker), fosfato de amônio monobásico - $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (Nuclear), cloreto de paládio (II) 99,99% (Aldrich), acetato de magnésio tetraidratado 99,99% (Aldrich), hidróxido de amônio - NH_4OH (Merck).

2.2.4. Equipamento

- Espectrômetro de Absorção Atômica: marca Perkin Elmer, modelo PC Zeeman 5100, com forno de grafite (modelo HGA 600) e amostrador automático (modelo HG 60). Nitrogênio ultra puro foi utilizado como gás de fluxo interno. A lâmpada utilizada para cádmio foi a de cátodo oco (HCL) com linha de ressonância principal 228,8 nm. Para a determinação de chumbo, uma lâmpada de descarga sem eletrodo (EDL) com linha de ressonância principal 283,3 nm foi empregada.

- Digestor infra-vermelho: modelo MA 4025 (Marconi)
- Potenciômetro: modelo 320 pH meter (Mettler Toledo)
- Pipetas automáticas: Finnpipett de 40-200 μ L e 200-1000 μ L (Labsystem)
- Banho ultra-som: modelo SX 20 (Microsonic)
- Purificador de água: Milli-Q Plus (Millipore)

2.2.5. Padrões

Os padrões de cádmio (Cd) e chumbo (Pb) foram preparados com água deionizada (18 M Ω cm, MilliQ), conforme a indicação do fabricante. A concentração final dos padrões foi de 1000 mg/L.

Diariamente, eram preparadas as soluções trabalho de Cd (10 e 20 μ g/L) e Pb (20, 40 e 80 μ g/L) a partir de uma solução de concentração intermediária de 10 μ g/mL dos padrões mencionados acima. O diluente destas soluções era HNO₃ 0,2%.

2.2.6. Modificadores químicos

Solução 4% de fosfato de amônio monobásico - NH₄H₂PO₄ - em HNO₃ 0,2%. Este modificador foi testado pois é um dos mais utilizados na determinação de vários elementos metálicos, inclusive Cd e Pb, sozinho ou em mistura com outros reagentes.

Paládio-Nitrato de magnésio (FALOMIR *et al.*, 1999): 150 mg de paládio foram dissolvidos em 350 μ L de HNO₃ 65% e então 150 μ L de HCl 37% foram adicionados (solução A). Cem miligramas de acetato de magnésio tetraidratado

foram dissolvidos em 500 μ L de água deionizada (solução B). As soluções foram então combinadas em 60mL de água deionizada, o pH foi ajustado a 7,0 com NH₄OH 25%. Levou-se ao volume de 100mL com água deionizada.

2.2.7. Tensoativos

Foram testadas soluções com concentrações de 0,5% e 10% de Triton[®] X-100 em HNO₃ 0,2% (NARRES *et al.*, 1985). Estas soluções de Triton[®] foram utilizadas para se obter soluções de amostras que não apresentassem separação de fases, problema muito comum em amostras de leite humano não pasteurizado. Também foram avaliadas as proporções (1:5), (1:3) e (1:1) de amostra:Triton[®] X-100.

2.2.8. Avaliação da programação do forno de grafite

Esta etapa do estudo fez-se necessária, pois a programação do forno indicada pelo fabricante do equipamento não se mostrou adequada. Observou-se que se a amostra não secasse antes da etapa de pirólise, a mesma espirrava em todo o forno, atingindo inclusive as janelas de quartzo. Em consequência da não adequação da programação de temperatura do forno de grafite, foram testadas diferentes combinações de temperatura e tempo para as etapas de secagem e atomização da amostra. A Tabela 2.2 traz a programação do forno de grafite recomendada pelo fabricante do equipamento para a determinação de cádmio (Cd) e chumbo (Pb).

Tabela 2.2: Programação do forno de grafite (recomendada pelo fabricante do equipamento) para cádmio e chumbo

Etapas	Temperatura (°C)	Rampa (s)	Tempo (s)	Fluxo de gás interno (mL/min)
Secagem	120	1	60	300
Pirólise	850	1	30	300
Resfriamento	20	1	15	300
Atomização				
Cd	1600	0	5	0
Pb	1800	0	5	0
Limpeza	2600	1	5	300

As combinações de tempo e temperatura testadas para a etapa de secagem foram: 130°C por 80 s, 140°C por 80 s, 130°C por 90 s e 140°C por 90 s.

Após os testes de programação de temperatura na etapa de secagem, verificou-se qual a melhor temperatura de atomização. O critério utilizado foi a obtenção da melhor (menor) massa característica, ou seja, a que mais se aproximava do valor sugerido pelo fabricante, e conseqüentemente a que gerasse a melhor (maior) inclinação da reta. As temperaturas de atomização do cádmio testadas foram 1700, 1800 e 2000°C. O tempo de atomização foi mantido o mesmo para as temperaturas testadas, sendo o mesmo de 5 segundos.

Para a determinação de chumbo foram utilizadas as mesmas combinações de temperatura e tempo na etapa secagem descritas para o cádmio. As demais etapas foram mantidas, com exceção da atomização. As temperaturas de

atomização testadas foram 1800 (recomendada pelo fabricante do equipamento), 2000 e 2200°C.

2.2.9. Controle de qualidade analítico

O controle de qualidade das análises empregou materiais de referência, brancos e amostras contaminadas artificialmente. Cada série de amostras analisada incluiu um branco, uma amostra contaminada artificialmente e uma amostra de referência doméstica. Material de referência adquirido do “National Institute of Standards and Technology” (antigo NBS), EUA, também foi utilizado para validação do procedimento analítico. As amostras contaminadas artificialmente permitiram monitorar possíveis perdas durante o tratamento das amostras (recuperação). O material de referência preparado no laboratório foi empregado para determinar a variação diária nas medições.

Os materiais de referência certificados sofreram abertura convencional. Foram analisados em triplicata e cada replicata foi acompanhada de branco correspondente. Um grama do material certificado, *Peach Leaves* (NIST 1547) foi pesado em tubo de 25 cm X 25 mm de borda reforçada. Foram adicionados 2 mL de ácido nítrico Suprapure (Merck) e a mistura foi deixada em repouso por uma noite, após leve agitação para misturar. No dia seguinte, a amostra foi deixada a 100 °C até a espuma desaparecer (cerca de 2 horas) no digestor por infravermelho. A temperatura foi elevada para 150°C e a mistura foi digerida até ficar clara. O tubo foi agitado periodicamente para a limpeza das paredes. Ácido nítrico foi repostado sempre que a amostra secava e enquanto a digestão ainda não

estava completa. Assim que a digestão estava completa (solução clara e transparente), a temperatura foi elevada para 200°C para secar a amostra. O resíduo foi dissolvido com ácido nítrico 0,2%, transferido quantitativamente para balão volumétrico de 5 mL e o volume completado. As condições de determinação de cádmio e chumbo nestas amostras foi a mesma utilizada para as amostras de leite humano.

2.2.10. Limpeza de vidraria, recipientes plásticos e demais utensílios que entram em contato com a amostra

Quando sujo, todo material era deixado de molho em solução de detergente de laboratório por pelo menos 3 horas. Em seguida, este era enxaguado com água de torneira e depois água destilada por 3 vezes. O material era então imerso em solução de HNO_3 10% (v/v) por 24 horas. Após enxágüe por no mínimo 7 vezes com água deionizada, o material era colocado para secar em posição invertida e ao abrigo de poeira.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1. Modificadores químicos

Os modificadores químicos, fosfato de amônio e paládio-magnésio, foram testados com soluções padrão de cádmio e chumbo. Nesta etapa do trabalho, várias curvas de calibração foram sendo geradas para cada um dos modificadores. Para a escolha do modificador químico foram levados em consideração: menor massa característica, maior inclinação da curva de

calibração e maior área integrada do pico de absorção. Três repetições foram obtidas para cada ponto da curva.

Para o elemento chumbo, o fosfato de amônio gerou valores médios de massa característica de 16 pg (12 pg, valor teórico) e para o cádmio 1 pg (0,5 pg, valor teórico). O uso de paládio-magnésio resultou em valores de massa característica de 22 pg e 1,5 pg para chumbo e cádmio, respectivamente. A área integrada do pico de absorção dos elementos foi menor no segundo caso que no primeiro. Consequentemente, as inclinações das curvas para paládio-magnésio foram menores quando comparadas com as obtidas com fosfato de amônio. Além do fosfato de amônio produzir melhores resultados, este apresentou maior facilidade no preparo e menor custo quando comparado ao paládio-magnésio. Portanto, o fosfato de amônio foi escolhido como modificador químico no presente trabalho.

Algumas dificuldades foram encontradas no preparo do modificador paládio-magnésio. Primeiro, no preparo da solução A nem todo o metal, o paládio, dissolveu e foi obtida uma mistura de coloração marrom com precipitado. Ao misturar as soluções A e B, a solução resultante adquiriu coloração vermelho-terra. O pH inicial dessa solução era 1,26 e foi acertado para pH 7 com NH_4OH 25%. Após acerto do pH a coloração da mistura passou para rosa translúcido.

2.3.2. Tensoativos

Duas concentrações do tensoativo Triton® X-100 foram testadas, 0,5% (SOARES & MORAES, 2003) e 10% (NARRES *et al.*, 1985). A concentração de 0,5% já foi bastante utilizada em nosso laboratório em trabalhos anteriores. Testou-se a concentração relatada por NARRES e colaboradores (1985), por ter sido usada especialmente em leite. Os últimos autores não utilizaram modificador químico na determinação de elementos metálicos em leite.

As diferentes concentrações 0,5% e 10% foram combinadas com as diferentes proporções (1:5), (1:3) e (1:1) de amostra e tensoativo. Amostras contaminadas artificialmente tanto com cádmio como com chumbo foram empregadas, a fim de se verificar os efeitos sobre a atomização (pico do padrão e “background”). Após a combinação da amostra contaminada artificialmente com as soluções de Triton® X-100, estas foram agitadas manualmente, com vigor, por 30 segundos. Depois eram colocadas nos tubos do amostrador e então analisadas.

Ambas as soluções de tensoativo geraram resultados parecidos, mas a solução de Triton® X-100 a 10% gerou um valor de background maior que o gerado pela solução a 0,5%. A espuma que era formada durante a agitação das amostras demorava mais para desaparecer na solução de 10% que em 0,5%, o que implicava em demora para iniciar a análise.

Diferentes proporções de amostra e tensoativo foram testadas em termos da menor quantidade de tensoativo capaz de manter a amostra homogênea, sem separação das fases aquosa e lipídica. As três proporções testadas (1:5), (1:3) e (1:1) produziram resultados satisfatórios e todas mantiveram a amostra

homogênea durante todo o tempo de análise. A repetibilidade foi verificada para as três leituras efetuadas em cada teste.

Os fatores menor diluição da amostra, desaparecimento mais rápido da espuma formada e economia de reagente indicaram a concentração de 0,5% de Triton[®] X-100 em HNO₃ 0,2% na proporção de 1:1 (amostra:Triton[®] X-100) como melhor opção.

No procedimento otimizado, 1 mL de amostra (referência doméstica, ou leite humano, ou referência certificada) foi pipetado e diluído com 1 mL de Triton[®] X-100 0,5% em HNO₃ 0,2%. A mistura foi então agitada manualmente, com vigor e colocada no tubo do autoamostrador. No autoamostrador, o modificador NH₄H₂PO₄ e as amostras eram aspirados e injetados no forno de grafite. A programação de temperatura utilizada está descrita na Tabela 2.3.

2.3.3. Programação do forno de grafite

Após a realização de todos os testes descritos no item 2.2.8., a melhor programação do forno de grafite para a determinação de cádmio (Cd) e chumbo (Pb) está descrita na Tabela 2.3.

Tabela 2.3: Programação do forno de grafite para a determinação de cádmio e chumbo em amostras (referência doméstica, leite humano e referência certificada)

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (s)	Tempo (s)	Fluxo de gás interno (mL/min)
Secagem	140	1	90	300
Pirólise	850	1	30	300
Resfriamento	20	1	15	300
Atomização				
Cd	2000	0	5	0
Pb	1800	0	5	0
Limpeza	2600	1	5	300

Para escolha da melhor programação do forno de grafite visando determinar cádmio (Cd) e chumbo (Pb) em leite humano, foram conduzidos testes utilizando primeiramente soluções de padrão. No caso de solução aquosa (padrões) a temperatura de 120°C foi adequada na etapa de secagem. No caso das amostras, a secagem não foi eficiente e na etapa de pirólise, a 850°C, a amostra espirrava por todo o tubo de grafite, inclusive atingindo as janelas de quartzo. Estas janelas, quando sujas, além de prejudicarem a repetibilidade das análises, provocam aumento na absorção da radiação, super estimando os valores de leitura. Nesta etapa da programação, a melhor combinação foi a temperatura de secagem 140°C e um tempo 90 segundos. As temperaturas de atomização foram testadas para verificar qual a melhor programação (temperatura x tempo) para o equipamento. Como mostra a Tabela 2.2, a melhor

temperatura de atomização para o Cd foi 2000°C. Esta temperatura é mais alta que a especificada pelo fabricante que é de 1600°C. Já para o chumbo não houve aumento da sensibilidade aumentando a temperatura de atomização e a temperatura de atomização, indicada pelo fabricante, 1800°C, foi mantida.

Com a mudança na temperatura de atomização dos elementos, foi testada mais uma vez a eficiência dos modificadores para verificar se havia diferença nos resultados já obtidos. Foi constatado que mesmo modificando a programação de temperatura do forno de grafite, o $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ continuou apresentando melhores resultados que o modificador paládio-magnésio.

2.3.4. Controle de qualidade analítico

A amostra de leite bovino UHT sem adição de padrão e não contaminada naturalmente foi usada como amostra de referência doméstica. Esta amostra foi analisada por dez dias consecutivos para a quantificação de Cd e Pb.

A recuperação e a repetibilidade foram testadas na amostra de referência doméstica artificialmente contaminada com cádmio (Cd) e chumbo (Pb). Para o cádmio o nível testado foi 6 µg/L e para o chumbo foi 80 µg/L. Os limites de detecção e quantificação do método foram calculados de acordo com as recomendações da “AMERICAN CHEMICAL SOCIETY” (1980). A amostra de leite bovino não contaminada e fortificada com padrão de Cd e Pb foi analisada 5 vezes no forno de grafite. O desvio padrão (SD) destas 5 leituras foi então calculado. O limite de detecção de cada elemento foi determinado como a menor quantidade que gerasse um sinal três vezes maior que o ruído (SD). O limite de quantificação

foi determinado como a menor concentração que produzisse um sinal cinco vezes maior que o limite de detecção. Curvas de calibração externa foram construídas para cada um dos elementos avaliados. Os resultados obtidos no controle de qualidade analítico estão dispostos na Tabela 2.4.

Tabela 2.4: Resultados do controle de qualidade analítico

Parâmetros	Chumbo	Cádmio
Linearidade ($\mu\text{g/L}$)	0 – 120	0 – 9
Limite de detecção ($\mu\text{g/L}$)	0,4	0,2
Limite de quantificação ($\mu\text{g/L}$)	2,0	1,0
Recuperação (%)	80 $\mu\text{g/L}$	6 $\mu\text{g/L}$
	102%	94%
Repetibilidade (%)	80 $\mu\text{g/L}$	6 $\mu\text{g/L}$
	10%	13%
Massa característica (pg)	16	1

A tabela 3, em ANEXOS, traz todos os valores de recuperação, para os níveis de 6 $\mu\text{g/L}$ para Cd e 80 $\mu\text{g/L}$ para Pb, obtidos durante os testes e análise das amostras de leite humano.

A determinação de Cd e Pb na amostra de referência certificada *Peach leaves* (NIST 1547) seguiu como descrito anteriormente no item 2.2.9. e os resultados são mostrados na Tabela 2.5.

Tabela 2.5: Teores de cádmio (Cd) e chumbo (Pb) em amostra de referência certificada (ARC)

ARC	Valor encontrado (µg/g)		Valor certificado (µg/g)	
	Cd	Pb	Cd	Pb
Peach leaves (NIST 1547)	0,019 ± 0,006	0,81 ± 0,09	0,026 ± 0,003	0,87 ± 0,03

Todos os valores que geraram esta tabela estão dispostos nas tabelas 1 e 2 em ANEXOS.

2.3.5. Avaliação da presença de cádmio e chumbo em leite humano

Setenta e uma amostras de leite humano maduro foram analisadas pelo método descrito anteriormente. Um mililitro de cada amostra foi diluído com 1 mL de Triton® X-100 0,5% em HNO₃ 0,2%. A mistura foi agitada manualmente, com vigor, e colocada nos tubos do autoamostrador. No autoamostrador, 20 µL da amostra eram colhidos juntamente com 10 µL de modificador e injetados no forno de grafite. A programação de temperatura do forno de grafite está descrita na Tabela 2.3. As amostras naturalmente contaminadas foram analisadas em triplicata e cada replicata analisada em dias diferentes. Em cada série de amostras foram utilizados branco dos padrões, branco das amostras, amostra de referência doméstica e um teste de recuperação.

Nenhuma das amostras analisadas estava contaminada com cádmio e apenas duas estavam contaminadas com chumbo, uma delas com 44 ± 5 µg/L e outra com 53 ± 4 µg/L, ambas pertencentes a nutrízes adultas de baixa condição sócio-econômica (ABCS). As duas doadoras eram empregadas domésticas, uma delas possuía índice de massa corporal acima de 25 (sobrepeso) e outra na faixa

de 20 – 25 (normal). A figura 2.1 traz os gráficos de absorvância com relação ao tempo dos padrões e das amostras contaminadas.

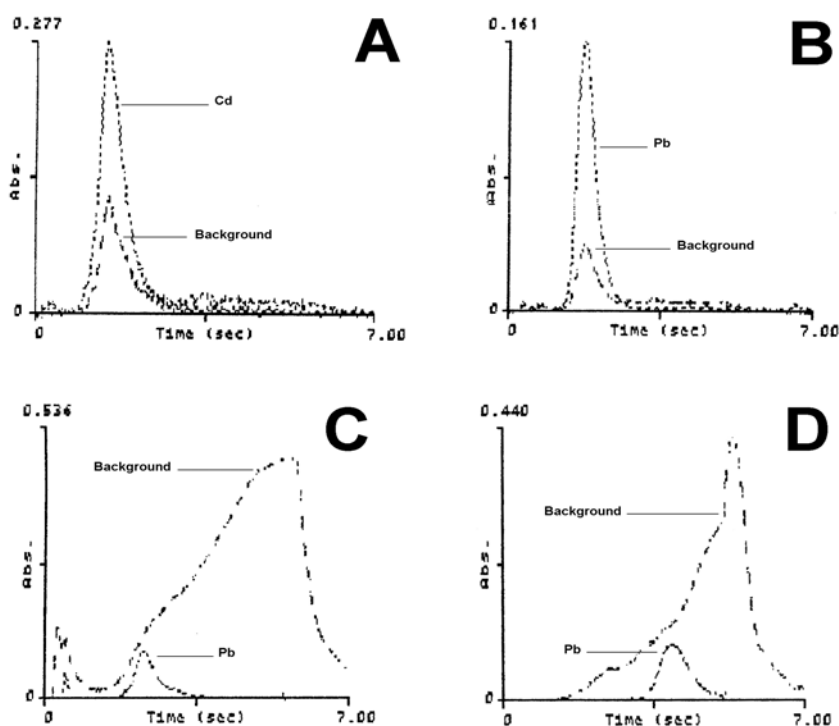


Figura 2.1: Gráficos de absorvância versus tempo. A) padrão de cádmio (Cd) 6 $\mu\text{g/L}$; B) padrão de chumbo (Pb) 80 $\mu\text{g/L}$; C) amostra de leite humano contaminada com 44 $\mu\text{g/L}$ Pb; D) amostra de leite humano contaminada com 53 $\mu\text{g/L}$ Pb.

Segundo o JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) a ingestão semanal tolerável provisória (PTWI) para chumbo é de 25 $\mu\text{g/ kg}$ de peso corpóreo/ semana (WHO, 1999) e para o cádmio é de 7 $\mu\text{g/ kg}$ peso corpóreo/ semana (WHO, 2004). Levando em consideração que um bebê de 6 meses pese em torno de 7 kg, a ingestão semanal tolerável seria de 175 μg para o chumbo e de 49 μg para o cádmio.

Considerando também que um bebê de 7 kg ingira cerca de 1000 mL de leite por dia, foi calculada a contribuição do leite humano na ingestão de cádmio e chumbo para um bebê que consumisse as amostras contaminadas. Para a amostra contaminada com 44 µg/L, o bebê estaria ingerindo por semana cerca de 308 µg de Pb e para a amostra contaminada com 53 µg/L estaria consumindo 424 µg Pb por semana. Estes valores são estão bem acima dos valores estabelecidos pelo JECFA (WHO, 1999) e poderiam representar risco para a saúde dos bebês.

2.4. CONCLUSÃO

Após os testes realizados foram escolhidos o modificador de matriz o $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 4%, o tensoativo Triton[®] X-100 0,5% na proporção de 1:1 (amostra: Triton[®] X-100) e as temperaturas de atomização de 2000°C para o cádmio e de 1800°C para o chumbo. O limite de detecção do método foi de 0,2 µg/L e 0,4 µg/L para cádmio e chumbo, respectivamente. A recuperação média para cádmio foi de 94% na concentração de 6 µg/L e para o chumbo foi de 102% na concentração de 80 µg/L. Os valores de repetibilidade, para as concentrações já citadas, foram de 13% para o cádmio e de 10% para o chumbo. As curvas de calibração mostraram-se lineares para o chumbo na faixa de 0 – 120 µg/L e para o cádmio de 0 – 9 µg/L.

Das setenta e uma amostras analisadas, nenhuma estava contaminada com cádmio e apenas duas contaminadas com chumbo. Ambas as amostras

faziam parte do grupo de nutrizes adultas de baixa condição socio-econômica. Estas mães estariam expondo semanalmente seus filhos a 308 e 424 μg de chumbo.

2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. **Analytical Chemistry**, v. 52, n. 14, p. 2242-2249, 1980.

DABEKA, R. W.; McKENZIE, A. D. Graphite- furnace atomic absorption spectrometric determination and survey of total aluminum, copper, manganese, molybdenum, and tin in infant formulas and evaporated milks. **Journal of the Association Official of Analytical Chemists International**, v. 75, n. 6, p. 954-963, 1992.

FALOMIR, P.; ALEGRIA, A.; BARBERÁ, R.; FARRÉ, R.; LAGARDA, M. J. Direct determination of lead in human milk by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, v. 64, n. 1, p. 111-113, 1999.

LOUEKARI, K.; UUSITALO, U.; PIETINEN, P. Variation and modifying factors of the exposure to lead and cadmium based on an epidemiological study. **The Science of the Total Environment**, v. 84, p. 1-12, 1989.

MILLER-IHLI, N. J. Trace element determinations in biologicals using atomic absorption spectrometry. **Journal of Research National Bureau of Standards**, v. 93, n. 6, p. 350-354, 1988.

MILLER-IHLI, N. J. Graphite furnace atomic absorption spectrometry for the analysis of biological materials. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 44, n. 12, p. 1221-1227, 1989.

MOREIRA, M. F. R.; CURTIUS, A. J.; CAMPOS, R. C. Determination of cadmium in whole blood and urine by electrothermal atomic absorption spectrometry using palladium-based modifiers and *in situ* decontamination. **The Analyst**, v. 120, n. 3, p. 947-950, 1995.

NARRES, H. D.; MOJL, C.; STOEPLER, M. Metal analysis in difficult materials with platform furnace Zeeman – atomic absorption spectroscopy. **Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung**, v. 181, n. 1, p. 111-123, 1985.

OMS. Organização Mundial de Saúde. **Elementos traço na nutrição e saúde humanas**. São Paulo: Roca, 1998. 297 p.

PATRIARCA, M.; MENDITTO, A.; ROSSI, B.; LYON, T. D. B.; FELL, G. S. Environmental exposure to metals of newborns, infants and young children. **Microchemical Journal**, v. 67, n. 1-3, p. 351-361, 2000.

SCHLEMMER, G.; RADZIUK, B. **Analytical graphite furnace atomic absorption spectrometry- a laboratory guide**. Germany: Birkhauser Verlag, 1999. 286p.

SOARES, L. M. V.; MORAES, A. M. M. Lead and cadmium content of Brazilian beers. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 285-289. 2003.

TAYLOR, A.; BRANCH, S.; CREWS, H. M.; HALLS, D. J. Atomic spectrometry update-Clinical and biological materials, foods and beverages. **Journal of Analytical Atomic Spectroscopy**, v. 8, n. 3, p. 79R-136R, 1993.

TAYLOR, A.; BRANCH, S.; HALLS, D. J.; OWEN, L. M. W.; WHITE, M. Atomic spectrometry update-Clinical and biological materials, foods and beverages. **Journal of Analytical Atomic Spectroscopy**, v. 15, n. 4, p. 451-487, 2000.

VINAS, R.; PARDO-MARTINEZ, M.; CAMPINILLO, N.; HERNANDEZ-CORDOBA, M. Fast determination of lead and copper in dairy products by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Journal of the Association Official of Analytical Chemists**, v. 82, n. 2, p. 368-373, 1999.

WHO. World Health Organization. **Summary and conclusions**. Fifty-third meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Rome, Italy, 1999. 21p. Disponível em:
<http://www.who.int/ipcs/food/jecfa/summaries/en/summary_53.pdf>. Acesso em: 10 abr. 2005.

WHO. World Health Organization. **Safety evaluation of certain food additives and contaminants**. Sixty-first meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Geneva, 2004. 563 p. Disponível em:
<<http://www.whqlibdoc.who.int/publications/2004/924166052X.pdf>>. Acesso em: 31 mar. 2005

Capítulo 3

CÁDMIO E CHUMBO EM LEITE HUMANO DO ESTADO DE SÃO PAULO

RESUMO

Avaliou-se a incidência de cádmio e chumbo em amostras de leite humano proveniente de cidades do Estado de São Paulo. As cidades participantes do estudo foram Campinas, Bauru, Presidente Prudente, Ribeirão Preto, São Paulo e Votuporanga. A técnica analítica empregada foi a espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite. A incidência de cádmio e chumbo no leite humano foi bastante baixa e não se concentrou em nenhuma cidade. Entre as trezentas amostras de leite humano analisadas, apenas 4 amostras estavam contaminadas com chumbo (9 a 26 $\mu\text{g/L}$) e apenas uma contaminada com cádmio (1,5 $\mu\text{g/L}$). Os resultados indicam que as cidades amostradas não sofrem com significativa contaminação ambiental ou de alimentos, o que se refletiria nos fluídos biológicos da população, no caso, no leite de nutrízes.

3.1. INTRODUÇÃO

A lactação, do ponto de vista energético, é a maneira mais eficiente de atender as necessidades alimentares dos mamíferos jovens, sendo o leite materno ativamente protetor, imunomodulador e ideal para suas necessidades (AKRÉ, 1994).

O leite materno e seu precursor, o colostro, permitem a adaptação do recém nascido e sua transição bem sucedida para a vida pós-natal independente. O colostro evolui para leite maduro entre 3 e 14 dias após o parto. O leite maduro possui dezenas de componentes conhecidos (carboidratos, proteínas, lipídios, vitaminas e sais minerais). Sua composição varia não apenas entre mães, como na mesma mãe entre mamas, entre mamadas diferentes e até no decurso da mesma mamada (AKRÉ, 1994).

O aleitamento materno é importante até o sexto mês de vida e incentivado até os dois anos de idade. O Brasil é reconhecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como na vanguarda em bancos de leite humano, tendo a maior e mais complexa rede do mundo. É um dos países com mais consciência da importância do aleitamento. O Estado de São Paulo lidera a rede nacional em quantidade de bancos de leite. O Hospital Maternidade Leonor Mendes de Barros e o Hospital das Clínicas da Ribeirão Preto são as duas referências estaduais (ALEITAMENTO, 2004).

Apesar dos benefícios do aleitamento materno, possíveis riscos de contaminação no leite por cádmio, chumbo, resíduos de pesticidas e dioxinas devem ser considerados (WAPPELHORST *et al.*, 2002). Estes contaminantes podem entrar no organismo das mães através de exposição ocupacional,

exposição ambiental ou ingestão através da dieta. Portanto, como a principal fonte de exposição a xenobióticos, durante os períodos neonatal e infância, é o leite materno, estudos que avaliem estes contaminantes no leite humano devem ser realizados (TURAN *et al.*, 2001; OSKARSSON *et al.*, 1998)

A exposição crônica ao chumbo em baixas concentrações está associada a efeitos adversos na saúde, especialmente em fetos e crianças jovens. A neurotoxicidade do chumbo resulta do fato de que a placenta não representa uma barreira para o transporte do chumbo do sangue da mãe para o feto, enquanto que ao mesmo tempo o cádmio é retido em cerca de 40-50%. Além disso, durante a gestação e a lactação a mobilização do chumbo dos ossos parece ocorrer, resultando no aumento da concentração de chumbo no sangue e no leite com potentes efeitos tóxicos no feto e na mãe. A toxicidade do cádmio é menos clara, embora muitos estudos com animais indiquem mudanças no mecanismo de defesa do cérebro, durante a gestação, que pode resultar em sérias implicações na saúde posterior do bebê (FRKOVIC *et al.*, 1997).

Um estudo realizado na Croácia por FRKOVIC *et al.* (1997) avaliou a incidência de cádmio e chumbo em leite humano. Os valores encontrados para chumbo foram de $10,4 \pm 13,1$ µg/L para mulheres com menos de 25 anos e $5,7 \pm 3,5$ µg/L para mulheres com mais de 25 anos. Os níveis de contaminação de cádmio variaram de $2,95 \pm 2,72$ µg/L para mulheres com menos de 25 anos e $2,32 \pm 1,67$ µg/L para mulheres com mais de 25 anos. Estes autores investigaram a existência de correlação entre a contaminação por estes elementos metálicos e a idade da mãe, o local de residência e o tabagismo. A única correlação

estatisticamente significativa foi o local onde as mães residiam. Mulheres que moravam em grandes cidades possuíam concentração maior de chumbo em seu leite, quando comparadas com mulheres que residiam em cidades menores ou em colônias. Neste trabalho, a contaminação por chumbo nas grandes cidades foi atribuída ao grande tráfego de veículos nas grandes cidades.

HONDA *et al.* (2003) avaliaram a incidência de cádmio em leite e na urina de 68 mulheres com idades entre 19 e 38 anos da cidade de Toyama, Japão. Todas as mulheres residiam em área não industrializada e 70% delas eram donas de casa. Este estudo avaliou também as inter-relações entre os elementos nutricionais majoritários (cálcio, magnésio, fósforo, sódio e potássio) e os elementos traço cobre, zinco e cádmio no leite humano. As concentrações de cádmio no leite variaram de 0,07 a 1,23 µg/L. Os resultados indicaram uma correlação inversa entre a concentração de cádmio e cálcio ($r = -0,248$, $P < 0,05$) no leite e que a presença de cádmio possivelmente afetava a secreção de cálcio pelas glândulas mamárias.

No estudo realizado na Áustria por GUNDACKER *et al.* (2002), foram determinados os níveis de chumbo (Pb) e mercúrio (Hg) em leite humano, em leite bovino e em formulações lácteas. Foram analisadas amostras de leite humano proveniente de Viena (urbana; $n = 59$), Linz (industrial; $n = 47$) e Tulln (rural; $n = 59$). As concentrações de chumbo encontradas no leite humano foram baixas, a média foi de 1,63 µg/L. Os autores investigaram a correlação entre os níveis de chumbo e mercúrio no leite materno com a idade, peso corporal, estado nutricional, área residencial, suplementação com vitaminas, obturação dentária,

tabagismo e prematuridade do feto. Os resultados indicaram que os fatores significativos na presença de metais no leite humano foram área residencial (Hg e Pb), prematuridade do feto (Hg), consumo de peixe (Hg) e cereais (Pb), suplementação com vitaminas (Hg) e tabagismo (Pb).

CONI *et al.* (2000) avaliaram, entre outros elementos metálicos, cádmio e chumbo em trinta amostras de leite de mulheres residentes em Turim, Itália. As concentrações médias encontradas foram 0,8 µg/L para o cádmio e 13 µg/L para o chumbo.

No Brasil, a maioria dos estudos realizados para levantamento de dados sobre contaminação de alimentos por cádmio e chumbo se concentra em alimentos destinados à população adulta. Os trabalhos realizados com leite humano normalmente focalizam carga microbiológica, minerais constituintes, e contaminantes como as dioxinas e resíduos de pesticidas. Em virtude da falta de dados sobre a presença de elementos metálicos, como cádmio e chumbo, em leite humano, os objetivos deste trabalho foram: (a) verificar os níveis de cádmio e chumbo no leite humano proveniente de bancos de leite humano de cidades do Estado de São Paulo, pertencentes a diferentes regiões do Estado; (b) verificar se havia diferença significativa entre o leite doado para os bancos de leite nas diversas cidades como indicação de exposição das mães aos contaminantes; (c) calcular a contribuição do leite humano na ingestão de chumbo e cádmio por lactentes nas diversas cidades.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Amostras

As amostras de leite humano maduro (30 a 90 dias de lactação) foram doadas pelos bancos de leite da Maternidade de Campinas, do Hospital Maternidade Leonor Mendes de Barros (centro de referência localizado em São Paulo, capital), do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Secretaria Municipal de Saúde de Votuporanga, da Secretaria Municipal de Saúde de Bauru e da Secretaria Municipal de Saúde de Presidente Prudente. Cada banco forneceu o leite de 50 doadoras diferentes.

3.2.2. Coleta das amostras

As doadoras retiraram o leite excedente ao longo do dia, num período mínimo de 7 (sete) e de no máximo 15 (quinze) dias, e armazenaram em congelador ou freezer. O leite foi guardado em frasco de vidro (borosilicato) com tampa rosqueável, lavado com detergente, bem enxaguado e esterilizado em autoclave e marcado PESQUISA, que foi distribuído para as mães. A mãe doadora foi orientada a lavar bem as mãos antes de retirar o leite, prender os cabelos ou usar gorro para evitar contaminação por fio de cabelo, a não conversar ou usar máscara quando estivesse fazendo a ordenha, a desprezar os primeiros jatos do leite para reduzir a presença de flora saprófita no produto, a guardar este leite no congelador imediatamente após a sua coleta, para impedir a proliferação de microrganismos que eventualmente tivessem conseguido se instalar no leite, apesar de todas estas medidas higiênicas. Os frascos de vidro PESQUISA foram transportados da casa da doadora até os Bancos de Leite, conforme rotina

adotada pelos mesmos. As amostras foram transportadas dos Bancos de leite para o laboratório de Espectrometria Aplicada à Análise de Alimentos/FEA/UNICAMP em caixa térmica contendo gelo reciclável. Estas foram conservadas a -18°C até o momento das análises.

Os frascos de vidro PESQUISA foram previamente lavados e imersos por 24 horas em detergente Extran neutro, enxaguados com água deionizada e colocados em solução de ácido nítrico 10% por 24 horas. Após esse período, foram enxaguados repetidas vezes com água deionizada e secos em estufa a 40°C. Este tipo de lavagem é necessário, pois é preciso garantir que está sendo entregue à mãe doadora um frasco sem nenhuma contaminação prévia de cádmio ou chumbo.

3.2.3. Reagentes e padrões

Padrão de Cádmio (grau absorção atômica, Carlo Erba), padrão de Chumbo (grau absorção atômica, Carlo Erba), ácido nítrico 65% (Suprapure, Merck), Triton® X-100 (J.T. Baker), fosfato de amônio monobásico- $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (Nuclear).

Os padrões de cádmio (Cd) e chumbo (Pb) foram preparados com água deionizada (18 M Ω cm, MilliQ) conforme a indicação do fabricante. A concentração final dos padrões foi de 1000 mg/L.

Diariamente, foram preparadas as soluções trabalho de Cd (10 e 20 $\mu\text{g/L}$) e Pb (20, 40 e 80 $\mu\text{g/L}$) a partir de uma solução de concentração intermediária de

10 µg/mL dos padrões mencionados acima. O diluente destas soluções foi HNO₃ 0,2%.

3.2.4 Modificador químico: Solução 4% de fosfato de amônio monobásico (NH₄H₂PO₄) em HNO₃ 0,2%.

3.2.5. Tensoativo: Solução de Triton[®] X-100 na concentração de 0,5% em HNO₃ 0,2%.

3.2.6. Equipamento

- *Espectrômetro de Absorção Atômica:* marca Perkin Elmer, modelo PC Zeeman 5100, com forno de grafite (modelo HGA 600) e amostrador automático (modelo HG 60). Nitrogênio ultra puro foi utilizado como gás de fluxo interno. A lâmpada utilizada para cádmio foi a de cátodo oco (HCL) com linha de ressonância principal 228,8 nm. Para a determinação de chumbo uma lâmpada de descarga elétrica (EDL) com linha de ressonância principal 283,3 nm foi empregada.

- *Pipetas automáticas:* Finnpipett de 40-200µL e 200-1000µL (Labssystem).

- *Banho ultra-som:* modelo SX 20 (Microsonic)

- *Purificador de água:* Milli-Q Plus (Millipore).

- *Balança analítica:* modelo HR-320 (A & D)

- *Digestor infravermelho:* modelo MA-4025 (Marconi)

3.2.7. Determinação de cádmio e chumbo

Um mililitro de cada uma das amostras foi misturado com 1 mL de Triton[®] X-100 0,5%, agitado manualmente com vigor e colocado em frasco do auto-amostrador. No auto-amostrador, o modificador químico $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 4% (10 μL) foi depositado juntamente com a amostra (20 μL) no tubo de grafite e iniciada a programação do forno de grafite dotado de plataforma de L'vov, conforme a Tabela 3.1. Três alíquotas de cada amostra foram injetadas e submetidas à programação de maneira a fornecer três leituras para cada amostra. As amostras, quando contaminadas, eram analisadas em triplicata e cada replicata analisada em dias diferentes.

Tabela 3.1: Programação do forno de grafite para a determinação de cádmio e chumbo.

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (s)	Tempo (s)	Fluxo de gás interno (mL/min)
Secagem	140	1	90	300
Pirólise	850	1	30	300
Resfriamento	20	1	15	300
Atomização				
Cd	2000	0	5	0
Pb	1800	0	5	0
Limpeza	2600	1	5	300

3.2.8. Controle de qualidade analítico

Cada série de amostras analisada incluiu um branco, uma amostra contaminada artificialmente e uma amostra de referência doméstica. Material de referência adquirido do “National Institute of Standards and Technology” (antigo NBS), EUA, também foi utilizado para validação do procedimento analítico. As amostras enriquecidas permitiram monitorar possíveis perdas durante o tratamento das amostras (recuperação). O material de referência preparado no laboratório foi empregado para determinar a variação diária nas medições. As amostras de referência certificadas foram abertas de maneira convencional, o que foi feito por digestão com ácido nítrico em tubo aberto em digestor infravermelho.

A amostra de referência certificada foi analisada em triplicata e cada replicata possuía um branco correspondente. Um grama do material de referência, *Peach leaves* (NIST 1547) foi pesado em tubo de 25 cm X 25 mm de borda reforçada. Foram adicionados 2 mL de ácido nítrico Suprapure (Merck). A mistura foi agitada e deixada em repouso até o dia seguinte, quando foi levada para o digestor infravermelho. A mistura ficou a 100 °C até a espuma desaparecer (cerca de 2 horas). A temperatura foi aumentada para 150°C e a mistura foi digerida até ficar clara. O tubo foi agitado periodicamente para limpeza das paredes do tubo. Sempre que necessário, ácido nítrico foi adicionado para completar a digestão. A temperatura foi elevada para 200°C para secar a amostra. O resíduo foi dissolvido em ácido nítrico 0,2% e transferido quantitativamente para balão volumétrico de 5 mL. O volume foi completado com ácido nítrico 0,2%. Cádmio e chumbo foram

determinados nestas amostras da mesma maneira que a usada para as amostras de leite humano, como descrito no item **3.2.7**.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Controle de qualidade analítico

Uma amostra de leite bovino UHT sem adição de padrão e não contaminada naturalmente foi usada como amostra de referência doméstica. Esta amostra foi analisada por dez dias consecutivos para a quantificação de Cd e Pb, e assim caracterizada como amostra de referência doméstica.

A recuperação e a repetibilidade foram testadas na amostra de referência doméstica artificialmente contaminada com solução padrão de cádmio (Cd) e chumbo (Pb). Os níveis testados foram 6 µg/L para o cádmio e 80 µg/L para o chumbo. Os limites de detecção e de quantificação do método foram calculados de acordo com as recomendações da “AMERICAN CHEMICAL SOCIETY” (1980). A amostra de leite bovino contaminada artificialmente com padrão Cd e Pb foi analisada 5 vezes no forno de grafite e o desvio padrão (SD) das 5 leituras foi calculado. O limite de detecção de cada metal foi determinado como a menor quantidade que gerasse um sinal três vezes maior que o ruído (SD). O limite de quantificação foi determinado como a menor concentração que produzisse um sinal cinco vezes maior que o limite de detecção. Curvas de calibração externa foram construídas para cada um dos metais avaliados.

Os resultados obtidos no controle de qualidade analítico estão dispostos na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Resultados do controle de qualidade analítico

Parâmetros	Chumbo	Cádmio
Linearidade ($\mu\text{g/L}$)	0 – 120	0 – 8
Limite de detecção ($\mu\text{g/L}$)	0,4	0,2
Limite de quantificação ($\mu\text{g/L}$)	2,0	1,0
Recuperação (%)	93 _(n=20)	79 _(n=17)
Repetibilidade (%)	8 _(n=20)	12 _(n=17)
Massa característica (pg)	16	1

A tabela 4 em ANEXOS traz os valores de recuperação que geraram os desta tabela durante a análise das amostras

Os valores encontrados na Tabela 3.3 são da determinação de Cd e Pb em amostras de referência certificada *Peach leaves* (NIST 1547).

Tabela 3.3: Teores de cádmio (Cd) e chumbo (Pb) em amostra de referência certificada (ARC)

ARC	Valor encontrado ($\mu\text{g/g}$)		Valor certificado ($\mu\text{g/g}$)	
	Cd	Pb	Cd	Pb
Peach leaves (NIST 1547)	$0,019 \pm 0,006$	$0,81 \pm 0,09$	$0,026 \pm 0,003$	$0,87 \pm 0,03$

Todos os valores que geraram esta tabela estão dispostos nas tabelas 1 e 2 em ANEXOS.

3.3.2. Incidência de cádmio e chumbo em leite humano e cálculo da ingestão provável por lactentes

Das trezentas amostras de leite humano analisadas neste trabalho, apenas 4 estavam contaminadas com chumbo e 1 com cádmio.

Nenhuma das amostras oriundas das cidades de Votuporanga, Presidente Pudente e São Paulo apresentaram contaminação por cádmio ou chumbo.

O JECFA estabeleceu a ingestão semanal tolerável provisória (PTWI) de 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corpóreo/ semana para o chumbo (WHO, 1999) e de 7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso corpóreo/ semana para o cádmio (WHO, 2004). Portanto, para um bebê de 7 quilos, a ingestão semanal tolerável de chumbo seria de 175 $\mu\text{g}/\text{semana}$ e de cádmio seria de 49 $\mu\text{g}/\text{semana}$.

Levando em consideração os valores de PTWI e o consumo de um litro de leite por um bebê de 7 quilos, calculou-se a contribuição do leite materno na ingestão de cádmio e chumbo por lactentes através das amostras que se apresentaram contaminadas, nas seguintes cidades:

Bauru

A cidade de Bauru foi escolhida, porque em 2002, uma empresa fabricante de acumuladores de automóveis foi, provisoriamente, interditada pela CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental) por estar lançando no meio ambiente grande quantidade de resíduos líquidos, sólidos e gasosos contendo chumbo. A interdição da fábrica se deu depois que análises do ar, solo e água confirmaram a alta concentração de chumbo no interior e fora dos limites da fábrica, provocando elevada contaminação e envenenamento por esse metal em 4

(quatro) crianças. A concentração de chumbo no sangue das 4 crianças chegou a 27 $\mu\text{g/dL}$, enquanto o índice aceitável é de 10 $\mu\text{g/dL}$ (CETESB, 2002; CAMPANILI, 2002)

Das cinqüenta amostras de leite humano analisadas no presente trabalho, uma estava contaminada com cádmio (1,5 $\mu\text{g/L}$) e outra com chumbo (22 $\mu\text{g/L}$).

Se um bebê (7 kg) consumisse um litro por dia do leite contaminado com 22 $\mu\text{g/L}$ de chumbo, durante uma semana, sua ingestão semanal de chumbo seria de 154 $\mu\text{g/}$ semana. Este valor representa cerca de 88% da PTWI, ou seja quase atinge o valor estabelecido pelo JECFA (WHO, 1999). Considerando o caso hipotético de um bebê de 7 quilos e que mame 1 litro de leite por dia, o consumo de leite contaminado com 1,5 $\mu\text{g/L}$ de cádmio, acarretaria uma ingestão de 10,5 μg ao final de uma semana. Este valor representa 21% da PTWI.

A amostra contaminada com cádmio (1,5 $\mu\text{g/L}$) pertencia a uma doadora de 25 anos, atendente de loja e moradora em bairro de classe média alta. A amostra contaminada com chumbo (22 $\mu\text{g/L}$) era de uma doadora de 35 anos, empregada doméstica e residente em bairro de classe média. Ambos os bairros eram centrais, distantes da região onde se deu o problema de contaminação ambiental da cidade.

Campinas

Dentre as 50 amostras analisadas, apenas uma amostra estava contaminada com chumbo no nível de 26 $\mu\text{g/L}$.

Na hipótese de um bebê (7 kg) consumir um litro por dia do leite contaminado com 26 $\mu\text{g/L}$ uma semana, sua ingestão semanal de chumbo seria de 182 μg . Este valor é cerca de 104 % da PTWI.

A amostra contaminada pertencia a uma doadora de 33 anos, psicóloga, residente em bairro de classe média.

Ribeirão Preto

Em Ribeirão Preto, duas amostras estavam contaminadas com chumbo, uma com 9 $\mu\text{g/L}$ e outra com 14 $\mu\text{g/L}$. A amostra com menor contaminação pertencia a uma doadora com 23 anos de idade, cabeleireira e habitante de um bairro de classe média da cidade. Já a amostra com maior nível de contaminação era de uma doadora de 33 anos de idade, arquiteta e residente em bairro de classe média alta.

Se um bebê consumisse um litro por dia do leite contaminado com 9 $\mu\text{g/L}$ sua ingestão seria de 63 μg / semana. Este valor é cerca de 36% da PTWI. Caso este mesmo bebê consumisse, por dia, um litro do leite contaminado com 14 $\mu\text{g/L}$, ao final de uma semana sua ingestão seria de 98 μg . Este valor corresponde a 56% da PTWI.

Nenhuma correlação pode ser feita quanto à região do Estado, idade, profissão e localização da residência da doadora com a contaminação por cádmio ou chumbo.

3.4. CONCLUSÃO

A incidência de cádmio e chumbo no leite humano foi bastante baixa nas cidades amostradas e não se concentrou em nenhuma cidade. Dentre as 300 amostras analisadas, apenas 4 amostras estavam contaminadas com chumbo (9 a 26 $\mu\text{g/L}$) e apenas uma contaminada com cádmio (1,5 $\mu\text{g/L}$). As amostras contaminadas pertenciam a mães com idades variando entre 23 e 33 anos, com diferentes profissões e localização residencial em áreas sem problema de contaminação ambiental.

Nos poucos casos de leite contaminado encontrado, os bebês que ingerissem o leite não estariam correndo risco em razão da ingestão estimada estar abaixo do valor considerado seguro pelo JECFA, exceto em um caso, do leite com concentração de 26 $\mu\text{g/L}$ de chumbo.

A presença de elementos metálicos, como o cádmio e o chumbo, no meio ambiente ou nos alimentos é uma das causas de contaminação de fluídos biológicos. O presente trabalho ao revelar a baixa incidência e baixos teores de cádmio e chumbo em leite humano indica paralelamente a ausência de contaminação ambiental e em alimentos nas cidades amostradas.

3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKRÉ, J. **Alimentação Infantil** – bases fisiológicas. 1994. Organização Mundial de Saúde, vol. 67, 1989 (texto original em inglês).

ALEITAMENTO. **O Brasil tem maior rede de banco de leite humano do mundo**, por Janaína Fidalgo. 2004. Disponível em: <http://www.aleitamento.org.br/noticiasblh.htm>. Acesso em 11 oct. de 2004

AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. **Analytical Chemistry**, v. 52, n. 14, p. 2242-2249, 1980.

CAMPANILI, M. Justiça fecha empresa em Bauru por contaminação ambiental. **O Estadão**. São Paulo, 10 abr. 2002. Disponível em: <http://www.estadao.com.br/ciencia/noticias/2002/abr/10/97.htm>. Acesso em: 13 abr. 2005.

CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. CETESB multa fábrica de baterias Ajax, de Bauru, em R\$ 100 mil. **Notícias CETESB**, São Paulo, 10 abr. 2002. Disponível em: http://www.cetesb.sp.gov.br/Noticias/002/04/10_ajax.asp. Acesso em: 11 abr. 2005.

CONI, E.; BOCCA, B.; GALOPPI, B.; ALIMONTI, A.; CAROLI, S. Identification of chemical species of some trace and minor elements in mature breast milk. **Microchemical Journal**, v. 67, n. 1-3, p. 187-194, 2000.

FRKOVIC, A.; KRAS, M.; ALEBIC-JURETIC, A. Lead and cadmium content in human milk from the Northern Adriatic area of Croatia. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 58, n. 1, p. 16-21, 1997.

GUNDACKER, C.; PIETSCHNIG, B.; WITTMANN, K. J.; LISCHKA, A.; SALZER, H.; HOHENAUER, L.; SCHUSTER, E. Lead and mercury in breast milk. **Pediatrics**, v. 110, n. 5, p. 873-878, 2002.

HONDA, R.; TAWARA, K.; NISHIJO, M.; NAKAGAWA, H.; TANEBE, K.; SAITO, S. Cadmium exposure and trace elements in human breast milk. **Toxicology**, v. 186, n. 2, p. 255-259, 2003.

OSKARSSON, A.; PALMINGER HALLÉN, I.; SUNDBERG, J.; PETERSSON GRAWE, K. Risk assessment in relation to neonatal metal exposure. **The Analyst**, v. 123, n. 1, p. 19-23, 1998.

TURAN, S.; SAYGI, S.; KILIÇ, Z.; ACAR, O. Determination of heavy metal contents in human colostrum samples by electrothermal atomic absorption spectrophotometry. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 47, n. 2, p. 81-85, 2001.

WAPPELHORST, O.; KÜHN, I.; HEIDENREICH, H.; MARKERT, B. Transfer of selected elements from food into human milk. **Nutrition**, v. 18, n. 4, p. 316-322, 2002.

WHO. World Health Organization. **Summary and conclusions**. Fifty-third meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Rome, Italy, 1999. 21p. Disponível em: http://www.who.int/ipcs/food/jecfa/summaries/en/summary_53.pdf. Acesso em: 10 abr. 2005.

WHO. World Health Organization. **Safety evaluation of certain food additives and contaminants**. Sixty-first meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Geneva, 2004. 563 p. Disponível em: <http://www.whqlibdoc.who.int/publications/2004/924166052X.pdf>. Acesso em: 31 mar. 2005

Capítulo 4

AVALIAÇÃO DA INCIDÊNCIA DE CÁDMIO E CHUMBO EM ALIMENTOS INFANTIS COMERCIALIZADOS NA CIDADE DE CAMPINAS, SP.

RESUMO

A incidência de cádmio e chumbo em alimentos infantis como formulações lácteas (36 amostras), formulações à base de soja (15 amostras), alimentos em forma de purê (68 amostras) e cereais infantis (39 amostras) comercializados em mercados e supermercados na cidade de Campinas, SP, foi avaliada. A determinação de cádmio (Cd) e chumbo (Pb) foi realizada por espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite. O modificador empregado foi $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 4%. O tensoativo Triton[®] X-100 foi utilizado na proporção de 1:1 (amostra:Triton[®] X-100) na concentração de 0,5%. Os limites de detecção foram 0,2 $\mu\text{g/L}$ para cádmio e 0,4 $\mu\text{g/L}$ para chumbo. Nenhuma das formulações lácteas e das a base de soja estava contaminada com chumbo e 5 amostras, a base de soja, estavam contaminadas com cádmio em concentrações de 2,4 a 5,2 $\mu\text{g/L}$ (18 a 41 $\mu\text{g/kg}$ na fórmula seca). Nas amostras de alimento infantil em forma de purê doce, a contaminação por Pb variou de 10 a 119 $\mu\text{g/kg}$ e para Cd variou de 5 a 18 $\mu\text{g/kg}$. Já nos alimentos em forma de purê salgado, os níveis de contaminação foram baixos tanto para cádmio, variando de 7 a 17 $\mu\text{g/kg}$, como para chumbo, variando de 13 a 44 $\mu\text{g/kg}$. Os cereais infantis analisados apresentaram baixa contaminação tanto por cádmio como por chumbo, mas duas marcas pertencentes ao mesmo fabricante e constando como ingrediente principal a farinha de arroz, estavam contaminadas com cádmio nos três lotes analisados. Os níveis de contaminação variaram de 17 a 37 $\mu\text{g/kg}$. Todas as amostras contaminadas não ofereciam risco à saúde de bebês e crianças pequenas.

4.1. INTRODUÇÃO

A alimentação merece estar no topo de prioridades de qualquer programa que tem como objetivo a saúde e o bem estar da criança. Uma alimentação adequada pode prevenir milhões de mortes causadas pela gastroenterite infantil e má nutrição. O leite é o principal alimento para bebês e crianças. A mais natural e melhor fonte é o aleitamento materno e ele é encorajado até os primeiros 6 meses de vida e deve, quando possível, ser mantido até os dois anos de idade. Para a mulher da zona urbana, as preparações prontas de leite comercializadas são convenientes na alimentação infantil. O leite integral cru proveniente de vacas ou de búfalas é um substituinte natural do leite materno para o lactente. Os leites em pó são leites preparados pela secagem de leites concentrados. Estes apresentam maior estabilidade e contêm proteína desnaturada, além de serem indicados para uma ampla faixa etária (TRIPATHI *et al.*, 1999).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que alimentos complementares sejam introduzidos a partir dos 4-6 meses de idade. Por alimento complementar entende-se qualquer alimento, sólido ou líquido, diferente do leite humano oferecido à criança amamentada. A tendência atual é a de recomendar alimentos complementares em torno dos 6 meses. Muitos países já adotam oficialmente esta recomendação, inclusive o Brasil, baseados em evidências de que a introdução dos alimentos complementares antes dos 6 meses (salvo em alguns casos) não oferece vantagens e pode ser prejudicial à saúde da criança (GIUGLIANI & VICTORA, 2000; MONTE & GIUGLIANI, 2004).

Para a maioria da população, o alimento é o usual e mais importante meio de exposição a elementos metálicos tóxicos provenientes do meio ambiente.

Neste contexto, a determinação de cádmio e chumbo em alimentos requer particular atenção. Mesmo em baixas concentrações, podem produzir efeitos adversos irreversíveis e são consideravelmente acumulados no organismo humano em órgãos específicos. Além disso, a resorção de cádmio e chumbo no trato digestivo é favorecida pelas ligações lipofílicas nos grupos S-S ou NH₂ das proteínas (NARRES *et al.*, 1985).

Com o aumento da poluição ambiental, um estudo avaliando as quantidades de cádmio e chumbo em alimentos é necessário (TRIPATHI *et al.*, 1999). Em crianças, a absorção do chumbo e cádmio ingeridos é proporcionalmente maior do que nos adultos e depende do tipo da dieta e do estado nutricional do indivíduo. O efeito tóxico em crianças é maior porque o chumbo depositado nos ossos fica em estado de constante mobilidade em razão do seu crescimento. O esqueleto, na primeira infância, aumenta quarenta vezes em relação à sua massa original, e durante esse período há uma maior capacidade de acumular chumbo. As crianças absorvem cerca de 40% do chumbo ingerido, enquanto que os adultos absorvem somente 5 a 10 % (OKADA *et al.*, 1997).

Sabe-se que a composição de alimentos infantis requer rigoroso controle de qualidade, com especial relevância para o conteúdo mineral (McKINSTY *et al.*, 1999). Muitas técnicas têm sido utilizadas para a análise elementar de uma grande faixa de matrizes, incluindo colorimetria, polarimetria, voltametria, fluorescência de raios-X, análise de ativação de nêutrons, eletroforese capilar e complexometria.

No Brasil, a maioria dos estudos de avaliação de cádmio e chumbo em alimentos foi realizada em alimentos destinados a população adulta. ELPO &

FREITAS (1995) determinaram cádmio e chumbo nos treze tipos de alimentos da cesta básica, representados por 3 ou 5 amostras de cada produto, de marcas e procedências diferentes, obtidos no comércio da cidade de Curitiba – PR, em 1993. Os resultados mostraram que de modo geral as concentrações de cádmio nos alimentos analisados não ultrapassavam o valor máximo permitido pela legislação brasileira que era de 1 µg/g. Estavam acima dos limites admissíveis as amostras de batata, pão, leite pasteurizado tipo C, óleo de soja e margarina e, dentro dos níveis permitidos, a farinha de trigo e arroz, café torrado e moído, tomate, banana, feijão, carne e açúcar refinado.

FÁVARO *et al.* (1994) determinaram elementos metálicos constituintes e contaminantes em dietas regionais do Brasil. Os autores estimaram uma ingestão diária de cádmio < 31,5 µg/dia para a população de Manaus, 6,3 – 16,7 µg/dia para habitantes de duas regiões do Estado de Santa Catarina e < 13,5 µg/dia para estudantes da Universidade de São Paulo.

Por não existirem dados no Brasil sobre a incidência de cádmio e chumbo em alimentos infantis complementares, o presente trabalho teve como objetivos: (a) avaliar a incidência de cádmio e chumbo em alimentos infantis como formulações lácteas, formulações a base de soja, alimentos na forma de purê e cereais infantis comercializadas na cidade de Campinas, SP, empregando espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite como técnica analítica; (b) calcular a contribuição dos alimentos complementares na ingestão de chumbo e cádmio por bebês consumidores destes produtos.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Amostras

Foram adquiridas 12 amostras de formulações lácteas e 5 amostras de formulações a base de soja destinadas a bebês com idade de 6 a 12 meses.

As amostras de alimentos em forma de purê foram divididas em salgadas e doces. As salgadas possuíam em sua composição legumes, vegetais, carnes, macarrão, arroz e feijão. Foram adquiridas 13 diferentes amostras salgadas. As amostras doces eram compostas de frutas, iogurte e cereais. Dezesete diferentes amostras doces foram analisadas.

Os cereais infantis eram compostos de aveia, arroz, milho e frutas (maçã, banana e mamão). A composição variava quanto à combinação dos compostos citados. Treze amostras foram adquiridas.

Foram adquiridos três lotes de cada uma das amostras citadas. Quando contaminadas, as amostras foram analisadas em triplicatas e as replicatas analisadas em dias diferentes.

4.2.2. Preparo das amostras

Formulações lácteas e a base de soja: as amostras foram preparadas conforme indicação no rótulo. A massa de formulação indicada para o preparo de 100 mL foi pesada em copo béquer em balança analítica e dissolvida com água deionizada morna. Após resfriamento foi transferida para balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com água deionizada na temperatura ambiente.

Alimentos em forma de purê e cereais: as amostras de alimentos em forma de purê e cereais infantis sofreram abertura de amostra por via úmida em sistema aberto, conforme descrito no item **4.2.6**.

4.2.3. Preparo de padrões e soluções

Reagentes: Padrão de Cádmio (grau absorção atômica, Carlo Erba), padrão de Chumbo (grau absorção atômica, Carlo Erba), ácido nítrico 65% (Suprapure, Merck), Triton® X-100 (J.T. Baker), fosfato de amônio monobásico- $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (Nuclear).

Padrões: Os padrões de cádmio (Cd) e chumbo (Pb) foram preparados com água deionizada (18 M Ω cm, MilliQ) conforme a indicação do fabricante. A concentração final dos padrões foi 1000 mg/L.

Diariamente foram preparadas as soluções trabalho de Cd (10 e 20 $\mu\text{g/L}$) e Pb (20, 40 e 80 $\mu\text{g/L}$) a partir de uma solução de concentração intermediária de 10 $\mu\text{g/mL}$ dos padrões. O diluente destas soluções foi HNO_3 0,2%.

Modificador químico: Solução 4% de fosfato de amônio monobásico ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) em HNO_3 0,2%.

Tensoativo: Solução de Triton® X-100 na concentração de 0,5% em HNO_3 0,2%.

4.2.4. Equipamento

- *Espectrômetro de Absorção Atômica*: marca Perkin Elmer, modelo PC Zeeman 5100, com forno de grafite (modelo HGA 600) e amostrador automático (modelo HG 60). Nitrogênio ultra-puro foi utilizado como gás de fluxo interno. A lâmpada utilizada para cádmio foi a de cátodo oco (HCL) com linha de ressonância principal 228,8 nm. Para a determinação de chumbo uma lâmpada de descarga elétrica (EDL) com linha de ressonância principal 283,3 nm foi empregada.
- Pipetas automáticas: Finnpipett de 40-200 μ L e 200-1000 μ L (Labsystem).
- Banho ultra-som: modelo SX 20 (Microsonic)
- Purificador de água: Milli-Q Plus (Millipore).
- Balança analítica: modelo HR-320 (A & D)
- Digestor infravermelho: modelo MA-4025 (Marconi)

4.2.5. Determinação de cádmio e chumbo

Um mililitro de cada uma das amostras, preparadas conforme o item **4.2.2.**, foi misturado com 1 mL de Triton X-100 0,5%, agitado manualmente com vigor e colocado em frasco do auto-amostrador. No auto-amostrador, o modificador químico $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 4% (10 μ L) foi depositado juntamente com a amostra (20 μ L) no tubo de grafite e iniciada a programação do forno de grafite dotado de plataforma de L'vov, conforme a Tabela 4.1. Três alíquotas de cada amostra foram injetadas e submetidas à programação de maneira a fornecer três leituras para cada amostra. As amostras contaminadas foram analisadas em triplicata e cada replicata analisada em dias diferentes.

Tabela 4.1: Programação do forno de grafite para a determinação de cádmio e chumbo

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (s)	Tempo (s)	Fluxo de gás interno (mL/min)
Secagem	140	1	90	300
Pirólise	850	1	30	300
Resfriamento	20	1	15	300
Atomização				
Cd	2000	0	5	0
Pb	1800	0	5	0
Limpeza	2600	1	5	300

4.2.6. Controle de qualidade analítico

Cada série de amostras que foi analisada incluiu um branco, uma amostra contaminada artificialmente e uma amostra de referência doméstica. Material de referência certificado adquirido do “National Institute of Standards and Technology” (antigo NBS), EUA, também foi utilizado para validação do procedimento analítico usado. As amostras contaminadas artificialmente permitiram monitorar possíveis perdas durante o tratamento das amostras (recuperação). O material de referência preparado no laboratório foi empregado para determinar a variação diária nas medições.

As amostras de referência certificadas sofreram abertura convencional, foram analisadas em triplicata e cada replicata possuía um branco

correspondente. Um grama do material de referência, *Peach leaves* (NIST 1547) foi pesado em tubo de 25 cm X 25 mm de borda reforçada. Foram adicionados 2 mL de ácido nítrico Suprapure (Merck) e a mistura foi deixada por uma noite em repouso. A mistura foi agitada levemente e levada para o digestor infravermelho. A temperatura ficou a 100 °C até a espuma desaparecer (cerca de 2 horas). A temperatura foi aumentada para 150°C e a mistura foi digerida até ficar clara. Para limpeza das paredes do tubo, periodicamente, o tubo foi agitado. Sempre que necessário, foi adicionado 1 mL de ácido nítrico para completar a digestão. A temperatura foi elevada para 200°C para secar a amostra. O resíduo foi dissolvido com ácido nítrico 0,2% e transferido quantitativamente para balão volumétrico de 5 mL. O volume foi completado com ácido nítrico 0,2%.

4.2.7. Material de referência preparado no laboratório

Purê doce, purê salgado e cereais – Um grama de cada um destes alimentos infantis foi artificialmente contaminado e analisado conforme descrito no item **4.2.6**. A amostra doce foi purê de goiaba e a salgada foi purê de galinha, vegetais e macarrão. A amostra de cereal possuía em sua composição uma mistura de cinco cereais. Em cada replicata foi adicionado 0,4 µg de chumbo ou 0,035 µg de cádmio. As concentrações finais de chumbo (0,4 µg) e de cádmio (0,035 µg) adicionados, correspondiam aos valores de concentração 80 µg/L de chumbo e 7 µg/L de cádmio. Cada tipo de amostra foi analisada 3 ou 4 vezes para verificação do procedimento de abertura e da leitura no espectrômetro de absorção atômica.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Controle de qualidade analítico

Uma amostra de leite bovino UHT sem adição de padrão e não contaminada naturalmente foi usada como amostra de referência doméstica. Para tanto, essa amostra foi analisada por dez dias consecutivos para a quantificação de Cd e Pb.

A recuperação e a repetibilidade foram testadas na amostra de referência doméstica artificialmente contaminada com cádmio (Cd) e chumbo (Pb). Os níveis testados foram 6 µg/L para o cádmio e 80 µg/L para o chumbo. Os limites de detecção e quantificação do método foram calculados de acordo com as recomendações da “AMERICAN CHEMICAL SOCIETY” (1980). A amostra de leite bovino não contaminada e fortificada com padrão Cd e Pb foi analisada 5 vezes no forno de grafite. O desvio padrão (SD) destas 5 leituras foi então calculado. O limite de detecção de cada metal foi determinado como a menor quantidade que gerasse um sinal três vezes maior que o ruído (SD). O limite de quantificação foi determinado como a menor concentração que produzisse um sinal cinco vezes maior que o limite de detecção. Curvas de calibração externa foram construídas para cada um dos metais avaliados.

Os resultados obtidos no controle de qualidade analítico estão dispostos na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Resultados do controle de qualidade analítico purês e cereais

Parâmetros	Chumbo	Cádmio
Linearidade (µg/L)	0 – 120	0 – 8
Limite de detecção (µg/L)	0,4	0,2
Limite de quantificação (µg/L)	2,0	1,0
Recuperação (%) (n=16)*	98	84
Repetibilidade (%)	8,5	12
Massa característica (pg)	16	1

Os valores de recuperação que geraram esta tabela, estão dispostos na tabela 5 em ANEXOS

Na determinação de Cd e Pb na amostra de referência certificada *Peach leaves* (NIST 1547), os valores encontrados são mostrados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Teores de cádmio (Cd) e chumbo (Pb) em amostra de referência certificada (ARC)

ARC	Valor encontrado (µg/g)		Valor certificado (µg/g)	
	Cd	Pb	Cd	Pb
Peach leaves (NIST 1547)	0,019 ± 0,006	0,81 ± 0,09	0,026 ± 0,003	0,87 ± 0,03

Todos os valores que geraram esta tabela estão dispostos nas tabelas 1 e 2 nos ANEXOS.

Como descrito no item **4.2.7.**, testes de recuperação foram realizados para verificar se ocorria perda de cádmio o chumbo durante o processo de digestão das amostras. Os dados obtidos estão dispostos na Tabela 4.4. Os resultados indicam que durante o processo de digestão que variou de 12 a 23 horas, dependendo do tipo de amostra, o procedimento empregado não implicava em perdas consideráveis do analito.

Tabela 4.4: Recuperação média (%) de chumbo e cádmio nos purês e cereais infantis.

Amostra	Elemento	N	Recuperação média (%)	CV(%)
Purê doce	Pb	4	98	2,5
	Cd	4	95	4,8
Purê salgado	Pb	4	97	4,5
	Cd	4	93	5,6
Cereal Infantil	Pb	3	92	6,1
	Cd	3	94	4,3

n – número de repetições realizadas em dias diferentes.

4.3.2. Incidência de cádmio e chumbo nas amostras

Formulações lácteas e a base de soja

Das 41 amostras analisadas, considerando os três lotes, nenhuma estava contaminada com chumbo. Cinco amostras (A₁, B₁, C₁, A₂ e B₂) estavam contaminadas com cádmio com níveis variando de $2,4 \pm 0,3$ a $5,2 \pm 1,3$ $\mu\text{g/L}$ Cd, como mostra a Tabela 4.5.

Tabela 4.5: Concentração de cádmio nas formulações a base de soja (n = 3)

Formulação	Amostra 1		Amostra 2		Amostra 3	
	Preparada ($\mu\text{g/L}$)	Seca ($\mu\text{g/kg}$)	Preparada ($\mu\text{g/L}$)	Seca ($\mu\text{g/kg}$)	Preparada ($\mu\text{g/L}$)	Seca ($\mu\text{g/kg}$)
A	$3,9 \pm 1,3$ (A ₁)	$29 \pm 9,4$ (A ₁)	$2,4 \pm 0,3$ (A ₂)	$18 \pm 2,0$ (A ₂)	Nd (A ₃)	Nd (A ₃)
B	$3,4 \pm 0,3$ (B ₁)	$27 \pm 2,5$ (B ₁)	$5,2 \pm 1,3$ (B ₂)	41 ± 10 (B ₂)	Nd (B ₃)	Nd (B ₃)
C	$4,6 \pm 1,0$ (C ₁)	$32 \pm 6,6$ (C ₁)	Nd (C ₂)	Nd (C ₂)	Nd (C ₃)	Nd (C ₃)

n = número de determinações

Nd = não detectado

A amostra seca refere-se à formulação como se apresenta na embalagem. A amostra preparada refere-se à formulação preparada para consumo infantil de acordo com as instruções do fabricante.

A conversão de $\mu\text{g/L}$ para $\mu\text{g/kg}$ foi feita considerando a massa necessária, conforme indicação do fabricante, para o preparo de 1000 mL de cada formulação

A Tabela 6, em ANEXOS, traz os valores de recuperação no período de realização das análises destas amostras.

As amostras 1, 2 e 3 correspondem a diferentes lotes da mesma formulação.

Como mostra a Tabela 4.5, as formulações A e B apresentaram contaminação em duas amostras cada uma (A₁, A₂, B₁ e B₂). Da formulação C,

apenas a amostra C₁ estava contaminada. A “amostra 3” de nenhuma das formulações estava contaminada. Uma característica comum a estes três produtos (formulações A, B e C) era a farinha de soja em sua composição. Este tipo de produto é destinado a bebês que são alérgicos ou não se adaptam a proteína do leite.

Considerando que um bebê de 6 meses pese em média 7 quilos, a ingestão tolerável seria de 49 µg de cádmio por semana, pois a PTWI para cádmio é de 7µg/ kg peso corpóreo/ semana (WHO, 2004). Lembrando que estas formulações (A, B e C) são indicadas para bebês acima de seis meses de idade e que consumam cerca de 1 litro por dia destes produtos, a contribuição das mesmas na ingestão de cádmio estaria entre 15 e 46 µg por semana. O consumo da amostra B₂ poderia atingir o valor máximo tolerado pelo JECFA.

EKLUND & OSKARSSON (1999) avaliaram a incidência de cádmio em 59 amostras de alimentos infantis, incluído formulações à base de soja e à base de leite comercializadas em duas cidades da Suécia. As concentrações de cádmio variaram de 1,10 a 23,5 µg/kg. As formulações a base de soja possuíam 6 vezes mais cádmio que as formulações a base de leite. A ingestão média semanal estimada variou entre 0,10 e 3,05 µg/ kg peso corpóreo ou seja, para um bebê de 7 kg, a ingestão semanal de cádmio variou de 0,70 a 21,4 µg.

DABEKA & MCKENZIE (1987) determinaram cádmio e chumbo em 115 amostras formulações (à base de leite e soja) e em 58 amostras de leite comercializadas em 7 cidades do Canadá. As concentrações de cádmio em formulações a base de soja variaram de 1,1 a 35 µg/kg. Os valores encontrados

no presente trabalho são mais elevados que os encontrados por DABEKA & McKENZIE (1987) e EKLUND & OSKARSSON (1999), variando de 16 a 51 $\mu\text{g/kg}$, mas estão na mesma ordem de grandeza.

Um fator que poderia estar causando a contaminação destas amostras é sua matéria prima, a soja. Este fato também foi observado no trabalho de DABEKA & McKENZIE (1987). Os autores relataram que a quantidade de cádmio nas formulações a base de soja eram de 8 a 15 vezes maior que em formulações a base de leite bovino.

Apesar de não ter sido detectado chumbo nas formulações investigadas neste trabalho, a literatura mostra uma faixa de contaminação bastante ampla para formulações infantis. DABEKA & McKENZIE (1987) analisaram amostras de formulações lácteas e a base de soja, coletadas em 7 cidades do Canadá em 1980. As concentrações de chumbo para as 25 amostras variaram de 9 a 532 $\mu\text{g/kg}$. THOMPSON (1993) encontrou valores bem mais baixos para formulações a base de leite, 0,23 a 0,96 $\mu\text{g/kg}$ Pb e para formulações a base de soja, 1,18 a 1,89 $\mu\text{g/kg}$ Pb.

Alimentos em forma de purê salgado e doce

Para a digestão das amostras doces, 3 mL de ácido nítrico e um período de 12 horas foram necessários para completa digestão. Já para as amostras salgadas, 5 mL e 14 horas foram necessárias para a digestão completa.

A Tabela 4.6 traz as concentrações de chumbo (Pb) e cádmio (Cd) encontrados nos alimentos infantis doces, na forma de purê. Como mostra esta tabela, doze dos purês examinados possuíam suas “amostras 1” contaminadas com Pb em níveis que variaram de 22 a 119 $\mu\text{g/kg}$. Quatro dos purês apresentaram suas “amostras 1” contaminadas com Cd em concentrações variando de 15 a 18 $\mu\text{g/kg}$. As “amostras 2” dos produtos D, F, G, H, L e R apresentaram contaminação por Pb, com concentrações variando de 10 a 103 $\mu\text{g/kg}$ e as dos produtos E, F, H e L apresentaram Cd nos níveis de 6 a 13 $\mu\text{g/kg}$. Já as “amostras 3” dos produtos A, D, F, G e H estavam contaminadas com Pb em concentrações entre 21 e 101 $\mu\text{g/kg}$ e as dos produtos E, F e H contaminadas com Cd em concentrações que variaram de 5 a 9 $\mu\text{g/kg}$.

Tabela 4.6: Níveis de chumbo (Pb) e cádmio (Cd) em alimentos em forma de purês doces

Produto	Pb (µg/kg)			Cd (µg/kg)		
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
A	Nd	Nd	43	Nd	Nd	Nd
B	33	Nd	Nd	5	Nd	Nd
C	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
D	36	86	47	Nd	Nd	Nd
E	57	Nd	Nd	8	6	5
F	119	97	101	18	7	9
G	30	17	21	Nd	Nd	Nd
H	95	103	78	8	13	6
I	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
J	22	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
L	113	90	LNE	Nd	9	LNE
M	37	LNE	LNE	Nd	LNE	LNE
N	104	LNE	LNE	Nd	LNE	LNE
O	Nd	LNE	LNE	Nd	LNE	LNE
P	Nd	LNE	LNE	Nd	LNE	LNE
Q	104	LNE	LNE	Nd	LNE	LNE
R	23	10	LNE	Nd	Nd	LNE

Nd = não detectado,

LNE = lote não encontrado.

As amostras 1, 2 e 3 correspondem a diferentes lotes do mesmo produto.

Como mostra a Tabela 4.6, os produtos que possuíam suas três amostras contaminadas tanto com cádmio como com chumbo eram F e H. A “amostra 1” do produto F se mostrou a mais contaminada tanto com cádmio (18 $\mu\text{g/kg}$) como com chumbo (119 $\mu\text{g/kg}$). Este produto possuía em sua composição frutas como maçã, mamão, suco de laranja e banana. Já o produto H continha como ingredientes iogurte, maçã, ameixa e creme de leite e sua amostra mais contaminada com chumbo (103 $\mu\text{g/kg}$) e cádmio (13 $\mu\text{g/kg}$) foi a “amostra 2”. Os produtos D e G apresentaram contaminação apenas por chumbo nas suas três amostras analisadas. A amostra mais contaminada por Pb do produto D foi a “2” (86 $\mu\text{g/kg}$) e a do alimento G foi a “1” (30 $\mu\text{g/kg}$). O produto G possuía como ingredientes banana e maçã. O produto D era composto de ingredientes como cereais (farinha de aveia, de cevada e de trigo), maçã, mamão, maracujá e mel. O produto E apresentou contaminação com cádmio em suas três amostras analisadas, mas as concentrações foram bastante baixas. Este produto era composto principalmente de banana.

A ingestão semanal tolerável provisória (PTWI) para chumbo é de 25 $\mu\text{g/kg}$ de peso corpóreo/ semana (WHO, 1999), ou seja, para um bebê de 7 quilos a ingestão tolerável seria de 175 μg de chumbo por semana. Tomando como base a concentração de chumbo (119 $\mu\text{g/kg}$) na “amostra 1” do produto F, a quantidade do pote como sendo de 120 g (uma porção) e que este bebê consumisse apenas 1 pote por dia desta amostra, calculou-se a contribuição desta amostra na ingestão de chumbo pelo bebê ao longo de uma semana. O valor encontrado foi de 100 $\mu\text{g/ semana}$, ou seja, 57% da PTWI.

A Tabela 4.7 traz os valores de concentração encontrados na determinação de cádmio e chumbo em alimentos infantis na forma de purê salgado. Como mostra esta tabela, cinco produtos (B, C, E, J e M) estavam com a “amostra 1” contaminada com chumbo e os valores variaram de 13 a 27 $\mu\text{g/kg}$. As “amostras 1” dos produtos C, L e N estavam contaminadas com cádmio em concentrações entre 11 e 27 $\mu\text{g/kg}$. Apenas duas “amostras 2” estavam contaminadas com chumbo, as dos produtos D e M, com 24 e 44 $\mu\text{g/kg Pb}$, respectivamente. Os produtos C, D e M apresentaram contaminação por cádmio na “amostra 2” e valores foram 12, 7 e 9 $\mu\text{g/kg}$, respectivamente. O produto D apresentou contaminação tanto por cádmio como por chumbo em sua “amostra 3”. Neste produto, as concentrações foram 41 $\mu\text{g/kg}$ de chumbo e 13 $\mu\text{g/kg}$ de cádmio. Os níveis encontrados em todas as amostras foram bastante baixos, não apresentando risco à saúde de bebês, com mais de 6 meses e crianças com menos de 2 anos.

Tabela 4.7: Níveis de chumbo (Pb) e cádmio (Cd) em alimentos em forma de purê salgado

Produto	Pb (µg/kg)			Cd (µg/kg)		
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
A	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
B	20	LNE	LNE	Nd	LNE	LNE
C	25	Nd	LNE	11	12	LNE
D	Nd	24	41	Nd	7	13
E	13	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
F	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
G	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
H	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
I	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
J	23	LNE	LNE	Nd	LNE	LNE
L	Nd	LNE	LNE	21	LNE	LNE
M	27	44	LNE	Nd	9	LNE
N	Nd	LNE	LNE	27	LNE	LNE

Nd = não detectado.

LNE = lote não encontrado.

As amostras 1, 2 e 3 correspondem a diferentes lotes do mesmo produto.

Cereais infantis

Para a digestão das amostras de cereais infantis foram necessários 13 mL de ácido nítrico e um período de 23 horas para completa digestão. Os valores de

concentração de cádmio e chumbo nas amostras (1, 2 e 3) de cada cereal estão dispostos na Tabela 4.8.

Tabela 4.8: Níveis de chumbo (Pb) e cádmio (Cd) em cereais infantis

Cereal	Pb (µg/kg)			Cd (µg/kg)		
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
A	Nd	Nd	Nd	Nd	33	8
B	Nd	Nd	44	Nd	Nd	Nd
C	Nd	165	97	Nd	Nd	Nd
D	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
E	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
F	Nd	Nd	Nd	25	11	17
G	Nd	Nd	Nd	20	Nd	Nd
H	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
I	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
J	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
L	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
M	61	Nd	Nd	23	27	37
N	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd

Nd = não detectado.

As amostras 1, 2 e 3 correspondem a diferentes lotes do mesmo produto.

ROCA de TOGORES *et al.* (1999) investigaram cádmio e chumbo em 29 amostras de cereais infantis comercializados na Espanha. As concentrações de cádmio nas amostras variaram de 6,6 a 35,8 $\mu\text{g/kg}$ e as de chumbo variaram de 36,1 a 305,6 $\mu\text{g/kg}$. Os valores encontrados no presente trabalho variaram entre 11 e 37 $\mu\text{g/kg}$ para cádmio e entre 61 e 165 $\mu\text{g/kg}$ para chumbo. Portanto, a faixa de concentrações encontradas coincide com a faixa inferior encontrada nos cereais infantis comercializados na Espanha.

Os cereais F e M apresentaram contaminação por cádmio em suas três amostras analisadas. As concentrações no cereal F variaram de 11 a 25 $\mu\text{g/kg}$. e no cereal M variaram entre 23 e 37 $\mu\text{g/kg}$. O cereal M também apresentou contaminação por chumbo, mas apenas na “amostra 1”, com 61 $\mu\text{g/kg}$ Pb. O cereal C apresentou chumbo em duas amostras e os valores foram os maiores encontrados, 165 e 97 $\mu\text{g/kg}$ Pb, para as “amostras 2” e “amostras 3”, respectivamente.

Os cereais F e M, contaminados com cádmio nas três amostras, possuíam em sua composição farinha de arroz e pertenciam ao mesmo fabricante. O cereal J também possuía em sua composição farinha de arroz, mas não apresentou contaminação por Cd em nenhuma das amostras analisadas. Apesar do arroz ser considerado um dos alimentos que mais contribui para a ingestão de cádmio (WHO, 2005), não é possível afirmar que a farinha de arroz seja a responsável pela contaminação por cádmio nestes cereais.

Considerando as indicações do fabricante dos cereais F e M, uma porção do mingau pode ser preparada 30 g destes cereais e 185 mL de leite ou água

devem ser adicionados. O nível de contaminação mais alto na “amostra 3” do cereal M ($37 \mu\text{g/kg Cd}$). Ao preparar o mingau, este cereal estaria fornecendo $1,1 \mu\text{g}$ de cádmio por porção. Considerando que um bebê consuma apenas uma porção deste mingau por dia, ao longo de uma semana a contribuição deste na ingestão de cádmio seria de $7,8 \mu\text{g}$ de cádmio. Lembrando que a ingestão semanal tolerável de cádmio para um bebê de 7 quilos é de $49 \mu\text{g}$, pode-se considerar que a ingestão de uma porção de mingau não colocaria em risco a saúde deste bebê, uma vez que representa 16% da PTWI de $7 \mu\text{g/ kg peso corpóreo/ semana}$ (WHO, 2004 e 2005).

A “amostra 2” do cereal C foi a que apresentou maior concentração de chumbo, $165 \mu\text{g/kg}$. Para o preparo de uma porção deste cereal, o fabricante recomenda 25 g em 190 mL de leite. O alimento pronto contribuiria com $4,1 \mu\text{g}$ por porção. Ao longo de uma semana, a contribuição na ingestão de chumbo deste alimento, para um bebê que consuma 1 porção por dia, seria de $29 \mu\text{g/semana}$. Este valor representaria 17% da PTWI ($25 \mu\text{g/ kg peso corpóreo/ semana}$) para um bebê que pese 7 quilos.

4.4. CONCLUSÃO

As amostras analisadas neste trabalho, apresentaram baixa incidência de cádmio ou chumbo. Trinta e três por cento das amostras de formulação a de soja estavam contaminadas com cádmio. Quanto aos alimentos em forma de purê doce, 56% das amostras estavam contaminadas com chumbo e 27% com cádmio.

Já nas amostras de purê salgado a porcentagem de contaminação foi de 28% para chumbo e 24% para cádmio. Finalmente, nas amostras de cereais infantis, 18% delas estavam contaminadas com chumbo e 23 % com cádmio.

Apenas uma amostra, de formulações a base de soja, se consumida diariamente (1000 mL) no período de uma semana, poderia resultar em ingestão equivalente à PTWI do cádmio. Nas demais amostras contaminadas o valor da contribuição na ingestão de cádmio ou chumbo não ultrapassaria 57% das respectivas PTWI(s). Portanto, a maioria das amostras destinadas ao público infantil não ofereceria risco a saúde desta parcela da população.

4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. **Analytical Chemistry**, v. 52, n. 14, p. 2242-2249, 1980.

DABEKA, R. W. & McKENZIE, A. Lead, cadmium, and fluoride levels in market milk and infant formulas in Canada. **Journal of the Association Official of Analytical Chemists International**, v. 70, n. 4, p. 754-757, 1987.

EKLUND, G.; OSKARSSON, A. Exposure of cadmium from infant formulas and weaning food. **Food Additives and Contaminants**, v. 16, n. 12, p. 509-519, 1999.

- ELPO, E. R. S.; FREITAS, R. J. S. Avaliação dos teores de cádmio, chumbo, cromo e níquel nos alimentos da cesta básica. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos (CEPPA)**, v. 13, n. 2, p. 85-90, 1995.
- FÁVARO, D. I. T.; MAIHARA, V. A.; ARMELIN, M. J. A.; VASCONCELLOS, M. B. A.; COZZOLINO, S.M. Determination of As, Cd, Cr, Cu, Hg, Sb, and Se concentrations by radiochemical neutron activation analysis in different Brazilian regional diets. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 181, n. 2, p. 385-394, 1994.
- GIUGLIANI, E. R. J.; VICTORA, C. G. Alimentação complementar. **Jornal de Pediatria**, v. 76, n. 3, p. S253-S262, 2000.
- 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 couple plasma – optical emission spectrometry (ICP-OES). **Food Chemistry**, v. 65, n. 2, p. 245-252, 1999.
- MONTE, C. M. G.; GIUGLIANI, E. R. J. Recomendações para alimentação complementar da criança em aleitamento materno. **Jornal de Pediatria**, v. 80, n. 5, p. S131-S141, 2004.
- NARRES, H. D.; MOJL, C.; STOEPLER, M. Metal analysis in difficult materials with platform furnace Zeeman – atomic absorption spectroscopy. **Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung**, v. 181, n. 1, p. 111-123, 1985.

ROCA de TOGOES, M.; FARRÉ, R.; FRIGOLA, A. M. Cadmium and lead in infant cereals – electrothermal absorption spectroscopic determination. **The Science of the Total Environment**, v. 234, n. 1-3, p. 197-201, 1999.

OKADA, I. A.; SAKUMA, A. M.; MAIO, F. D.; DOVIDAUSKAS, S.; ZENEBON, O. Avaliação dos níveis de chumbo e cádmio em leite em decorrência de contaminação ambiental na região do Vale do Paraíba, Sudeste do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, n. 2, p. 140-143, 1997.

THOMPSON, J. J. Determination of ultratrace levels of lead in infant formulas by isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of the Association Official of Analytical Chemists International**, v. 76, n. 6, p. 1378-1384, 1993.

TRIPATHI, R. M.; RAGHNATH, R.; SASTRY, V. N.; KRISHNAMOORTHY, T. M. Daily intake of heavy metals by infant's milk and milk products. **The Science of the Total Environment**, v. 227, n. 2-3, p. 229-235, 1999.

WHO. World Health Organization. **Summary and conclusions**. Fifty-third meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Rome, Italy, 1999. 21p. Disponível em:
<http://www.who.int/ipcs/food/jecfa/summaries/en/summary_53.pdf>. Acesso em: 10 abr. 2005.

WHO. World Health Organization. **Safety evaluation of certain food additives and contaminants**. Sixty-first meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Geneva, 2004. 563 p. Disponível em: <<http://www.whqlibdoc.who.int/publications/2004/924166052X.pdf>>. Acesso em: 31 mar. 2005

WHO. World Health Organization. **Summary and conclusions of the sixty-fourth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)**. Rome, Italy, 2005. Disponível em: <http://www.who.int/ipcs/jecfa/summaries/en/summary_report_64final.pdf>. Acesso em: 13 mar. 2005.

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados do presente trabalho mostraram que menos de 2% das amostras de leite humano, das 371 amostras analisadas e colhidas nas principais cidades das 5 regiões do Estado de São Paulo estavam contaminadas com cádmio ou chumbo. Os níveis encontrados indicam que os bebês de 3 nutrízes correriam risco de intoxicação por chumbo. Nenhuma correlação pôde ser observada entre a incidência de cádmio ou chumbo e idade, local de residência e profissão das doadoras.

No levantamento realizado em alimentos infantis complementares industrializados como cereais, formulações lácteas, formulações a base de soja e alimentos em forma de purê, observou-se que os teores de cádmio e chumbo nestes alimentos eram baixos e que estes não representariam risco à saúde de bebês e crianças pequenas (até dois anos de idade).

Anexos

Tabela 1: Determinação de cádmio ($\mu\text{g/g}$) em material de referência certificado (NIST 1547)

	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	7 ^a
Replicata 1	0,012	0,024	0,018	0,014	0,010	0,023	0,022
Replicata 2	0,008	0,032	0,030	0,019	0,019	0,018	0,031
Replicata 3	0,013	0,029	0,021	0,015	0,013	0,015	0,022
Média ($\mu\text{g/g}$)	0,011	0,028	0,023	0,016	0,014	0,019	0,025
σ ($\mu\text{g/g}$)	0,0026	0,0040	0,0062	0,0026	0,0046	0,0040	0,0052
CV (%)	24	14	27	17	33	21	21

Somando todas as médias obtidas:

Concentração = 0,019 ($\mu\text{g/g}$)

Desvio padrão = $\pm 0,006$

Tabela 2: Determinação de chumbo ($\mu\text{g/g}$) em material de referência certificado (NIST 1547)

	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	7 ^a
Replicata 1	0,72	0,84	0,88	0,83	0,96	0,89	0,90
Replicata 2	0,61	0,63	0,74	0,97	0,77	0,78	0,83
Replicata 3	0,62	0,76	0,81	0,89	0,89	0,98	0,78
Média ($\mu\text{g/g}$)	0,65	0,74	0,81	0,90	0,87	0,88	0,84
σ ($\mu\text{g/g}$)	0,0608	0,1060	0,070	0,0702	0,0961	0,1002	0,0603
CV (%)	9,4	14	8,6	7,8	11	11	7,2

Somando todas as médias obtidas:

Concentração = 0,81 ($\mu\text{g/g}$)

Desvio padrão = $\pm 0,09$

Tabela 3: Recuperação de cádmio e chumbo para o capítulo 2

Nº. de medidas	Cádmio (6 µg/L)	Chumbo (80 µg/L)
01	75,3	102
02	67,9	77,7
03	87,8	101
04	70,3	98,0
05	98,3	95,7
06	99,6	113
07	71,8	91,3
08	78,3	97,0
09	105	102
10	99,3	98,5
11	92,2	113
12	109	110
13	98,0	104
14	106	109
15	99,7	116
16	94,7	104
17	106	112
18	108	106
19	91,9	83,6
20	98,1	106
21	99,4	101
22	92,7	82,1
23	104	107
24	94,8	100
Média (%)	94	102
CV(%)	13	10

**Tabela 4: Recuperação de cádmio e chumbo para o capítulo 3
(leite humano São Paulo)**

Nº. de medidas	Cádmio (6 µg/L)	Chumbo (80 µg/L)
01	70,1	101,3
02	77,9	90,2
03	62,3	71,3
04	81,2	85,8
05	79,4	92,7
06	70,0	95,5
07	71,5	91,7
08	94,2	103
09	80,7	95,9
10	76,6	100
11	73,0	79,7
12	90,1	93,2
13	72,2	99,1
14	78,3	101
15	97,8	90,7
16	80,3	94,2
17	93,7	91,7
18	-----	89,4
19	-----	95,8
20	-----	90,3
Média (%)	79	93
CV(%)	12	8,0

**Tabela 5: Recuperação de cádmio e chumbo para o capítulo 4
(purês e cereais)**

Nº. de medidas	Cádmio (6 µg/L)	Chumbo (80 µg/L)
01	83,6	105,9
02	70,3	90,6
03	98,6	86,0
04	75,1	95,5
05	72,8	113
06	85,7	83,7
07	70,9	92,8
08	93,0	109
09	81,4	98,6
10	102	100
11	70,1	95,3
12	93,2	98,2
13	88,6	110
14	79,7	93,3
15	83,0	96,3
16	89,3	97,6
Média (%)	84	98
CV(%)	12	8,5

**Tabela 6: Recuperação de cádmio e chumbo para o capítulo 4
(formulações lácteas e a base de soja)**

Nº. de medidas	Cádmio (6 µg/L)	Chumbo (80 µg/L)
01	80,2	98,7
02	85,4	90,3
03	72,0	85,1
04	65,7	102
05	88,0	93,2
06	78,4	90,3
07	90,0	78,6
08	71,3	95,4
09	78,0	101
Média (%)	79	93
CV (%)	10	8,0