

EMANUEL FELIPE DE OLIVEIRA FILHO

Metais essenciais e tóxicos: suas concentrações no leite de vacas da região do Agreste Pernambucano e em queijos artesanais da Galícia - Espanha

RECIFE-PE

2020



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

EMANUEL FELIPE DE OLIVEIRA FILHO

**Metais essenciais e tóxicos: suas concentrações no leite de vacas da região
do Agreste Pernambucano e em queijos artesanais da Galícia - Espanha**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Orientador: Pierre Castro Soares
Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE

RECIFE-PE

2020

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**Metais essenciais e tóxicos: suas concentrações no leite de vacas da região
do Agreste Pernambucano e em queijos artesanais da Galícia - Espanha**

Tese de Doutorado elaborada por:

EMANUEL FELIPE DE OLIVEIRA FILHO

Aprovada em/...../.....

BANCA EXAMINADORA

.....
Prof. Dr. Pierre Castro Soares
Departamento de Medicina Veterinária/UFRPE (Orientador)

.....
Profa. Dra. Maria José de Sena
Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE

.....
Profa. Dra. Maria Marta López Alonso
Universidade de Santiago de Compostela – Espanha/USC

.....
Profa. Dra. Maria Inés Miranda Castañón
Universidade de Santiago de Compostela – Espanha/USC

.....
Prof. Dr. José Augusto Bastos Afonso
Clínica de Bovinos de Garanhuns/UFRPE

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo autor

E53 Oliveira Filho, Emanuel Felipe

Metais essenciais e tóxicos: suas concentrações no leite de vacas da região do Agreste Pernambucano e em queijos artesanais da Galícia - Espanha / Emanuel Felipe de Oliveira Filho. -- 2020.

82 f.: il.

Orientador: Pierre Castro Soares.

Inclui referências.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Recife, 2020.

1. palavra-chave: Bovinocultura de leite, contaminação, Espanha, metais essenciais, metais pesados, Pernambuco - Brasil, queijo. I. Soares, Pierre Castro, Orientador II. Título

CDD 636.089

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu pai e avô, José Porfírio e a minha irmã Elda Naate, a luta, força e coragem de vocês me incentiva todos os dias a ser um homem melhor.

À vocês toda a minha gratidão e amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por estar presente em todos os momentos da minha vida, por me guiar, proteger, iluminar e abençoar sempre, por tudo o que aconteceu, acontece e acontecerá.

A toda a minha família {principalmente minha mãe (Josenilda), meu Avô e Pai (José Porfírio) e minha mãezinha (Ivanete Francisca), irmã (Elda Naate), tias (Joseane e Joselma) e primos, mesmo não concordando e nem apoiando muitas vezes a minha escolha profissional e pessoal, sempre estiveram ao meu lado e nunca me desamparam.

Ao professor, orientador e amigo Dr. Pierre Castro Soares sou eternamente grato por tudo, não só pelo profissional exemplar e excepcional pessoa, mas também pela oportunidade de trabalho, colaboração, incentivo, ensinamentos, elogios, críticas, confiança e pela fraternidade. A quem tenho uma grande admiração, respeito e carinho.

As professoras Martas Miranda e Marta López Alonso pela orientação, oportunidade de trabalho, colaboração, incentivo, ensinamentos, elogios, críticas, confiança e pela fraternidade construída.

A Fernanda Ganem por ser meu amor, companheira, amiga, confidente, por todo suporte, refúgio, incentivo, pelos ensinamentos, elogios, críticas, confiança, por toda amizade, carinho, compreensão enfim, por tudo.

Aos irmãos que a UFRPE e a pós-graduação me deram, Daniel Nunes, Bruno Pajeú e Júnior Mário (Saloá) pela vivência, por me espelhar tanto pessoalmente quanto profissionalmente, pelos conselhos, críticas, auxílio, palavra amiga, elogios, por serem irmãos (mesmo sem laço sanguíneo) e pela amizade.

A minha família de domingo (Pernambucar-te), por ser não só um grupo de percussão, mas uma família, suporte, refúgio para mim, principalmente a Rodrigo César (Maloca), Juliana Ribeiro (Juh), Rafael Aguiar (Sexta), Lisandra (Lys), Ubiratan (Bira), Valter e Andrey.

A Samara Viana, Bárbara Viana e Dona Rita por tudo, principalmente por todo incentivo, ensinamentos, elogios, críticas, confiança, por toda amizade, carinho e respeito. A quem sou eternamente grato.

Aos amigos Alcir (Presidente), Ramon Santana, Léo, Marquinhos, Dona Sônia, Irmã (Cleide), Claudinha, Anderson, Ricardo, Alexandre Dantas, por todos os momentos e auxílio.

Aos amigos do PDSE (Marcel, Amanda, Cris, Fran, Mônica, Diego, Fernanda, Gustavo, Rafa e Priscila) que foram fundamentais na adaptação, acolhida na Espanha, obrigado por todos os momentos, viagens, risadas, discussões, elogios, críticas, ensinamentos.

A todos da Clínica de Bovinos de Garanhuns - CBG pelas contribuições (principalmente a Dr. José Augusto e demais servidores).

Ao melhor restaurante universitário do Brasil (RU da UFRPE), principalmente a dona Cleide e demais servidores.

Aos animais e proprietários dos estabelecimentos de todos os municípios do Agreste e mercados públicos da Espanha o meu muito obrigado, respeito e eterno agradecimento.

Aos professores(as) do Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da UFRPE, por todos os ensinamentos e saber compartilhado.

Ao Centro de Apoio a Pesquisa – CENAPESQ (Patrícia Oliveira, Júlio, Marcelo de Andrade, Dona Edna e demais servidores).

Ao Centro de Apoio Científico-Tecnológico (CACTUS) do *Campus* Terra da USC juntamente com a Rede de Infraestruturas de Apoio à Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (RIAIDT) (principalmente a Dra. Verônica Piñeiro e demais servidores).

Aos colegas do laboratório de Doenças Carenciais, Metabólicas e Intoxicações de Ruminantes Ayna Arramis, Daniel Praia, Felipe Rosendo, Bruna Higino, Bruna Menezes, Bianca, Cristina por todo auxílio e coleguismo.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária por ser na maior parte do tempo minha segunda casa e por proporcionar a oportunidade de realização profissional e pessoal.

A Universidade de Santiago de Compostela, *Campus* Terra (Lugo-Espanha) por proporcionar a oportunidade de realização profissional e pessoal (principalmente aos professores do departamento de Patologia Animal e Clínicas Veterinárias, além dos técnicos do ambulatório de grandes animais, ao Prof^o Dr. Lucas Rigueira, Prof^o Dr. Victor Pereira e demais servidores).

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do estado de Pernambuco (FACEPE) pela concessão da bolsa.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa a nível de Doutorado Sanduíche.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente na realização de mais este sonho.

O meu muito, muito, muito obrigado!

“A fé na vitória tem que ser inabalável”

(O Rappa – Anjos, 2013)

“Eu faço figa pra esta vida tão sofrida, terminar bem sucedida.”

(Lucro – Baiana System, 2018)

“Entrega o teu caminho ao Senhor, confia nele e ele tudo fará.”

Salmos 37:5

RESUMO

Atualmente há uma grande preocupação com a contaminação ambiental antropogênica por metais essenciais e tóxicos, com elevado potencial tóxico a saúde animal e pública. O objetivo deste trabalho é determinar a concentração de metais pesados no leite bovino integral cru produzido no Agreste Meridional do estado de Pernambuco. Foram coletadas 142 amostras de 15 mL cada, em 14 propriedades distribuídas aleatoriamente. As amostras de leite foram refrigeradas a -4°C , para posterior digestão em micro-ondas seguida de análise em espectrômetro de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES), as quais foram analisadas em duplicata, a média calculada e os resultados expressos em mg/L. Foram determinados: chumbo (Pb), cádmio (Cd), cobre (Cu), zinco (Zn) e ferro (Fe) por espectrometria de emissão atômica indutivamente acoplado ao plasma (ICP-OES). Verificou-se a presença de metais Pb (0,0431 mg/L), Cd (0,0069 mg/L), Zn (0,6212 mg/L), Cu (0,0195 mg/L) e Fe (0,0545 mg/L), com o Pb em níveis acima do limite de tolerância estabelecido pela ANVISA, sendo considerados fatores de risco a saúde animal e humana, bem como sendo necessária a tomada de medidas de controle sobre esta contaminação. Atribui-se a proximidade com rodovias e contaminação ambiental como um dos principais fatores de contaminação.

A região da Galícia é considerada a maior e mais importante produtora de leite e produtos derivados, como os queijos artesanais em toda a Espanha. Objetivou-se avaliar as concentrações de metais essenciais e tóxicos em queijos artesanais da Galícia-Espanha. Foram coletadas 58 amostras de três tipos distintos de queijos (industriais, artesanais e orgânicos) produzidos e comercializados na região da Galícia. As amostras foram obtidas em três cidades da região, Santiago de Compostela, Lugo e Coruña. Foram analisados 14 elementos minerais (As, Cd, Co, Cr, Cu, I, Fe, Pb, Mn, Hg, Mo, Ni, Se e Zn), determinadas em triplicata por ICP-MS. Os resultados obtidos comprovam que os resíduos de elementos essenciais e tóxicos estão dentro dos limites estabelecidos pela União Europeia, correspondendo a áreas geográficas de baixo nível de exposição e/ou contaminação ambiental. Desta forma, o consumo de queijos artesanais galegos não pode ser considerada uma fonte de metais pesados, sua produção e consumo não é um risco a saúde pública.

Palavras-Chave: Bovinocultura de leite, contaminação, Espanha, metais essenciais, metais pesados, Pernambuco - Brasil, queijo.

ABSTRACT

Currently, there is great concern about anthropogenic environmental contamination by heavy metals, with a high toxic potential for animal and public health. The objective of this work is to determine the concentration of heavy metals in raw whole bovine milk produced in Semiarid Meridional in the state of Pernambuco. 142 samples of 15 ml each were collected in 14 properties randomly distributed. The milk samples were refrigerated at -4°C, for subsequent digestion in microwave followed by analysis on an inductively coupled plasma atomic emission spectrometer (ICP-OES), which were analyzed in duplicate, the calculated average and the results expressed in mg / L. Lead (Pb), cadmium (Cd), copper (Cu), zinc (Zn) and iron (Fe) were determined by inductively coupled plasma emission spectrometry (ICP-OES). The presence of metals Pb (0.0431 mg/L), Cd (0.0069 mg/L), Zn (0.6212 mg/L), Cu (0.0195 mg/L) and Fe (0,0545 mg/L), with Pb at levels above the tolerance limit established by ANVISA, being considered risk factors for animal and human health, as well as being necessary to take control measures on this contamination. The proximity to highways and environmental contamination is attributed as one of the main contamination factors.

The Galicia region is the largest and most important producer of milk and dairy products, such as artisanal cheeses throughout Spain. The objective was to evaluate the concentrations of essential and toxic metals in artisanal cheeses from Galicia-Spain. 58 samples of three different types of cheese (industrial, artisanal and organic) produced and marketed in the Galicia region were collected. The samples were obtained in three cities in the region, Santiago de Compostela, Lugo and Coruña. 14 mineral elements (As, Cd, Co, Cr, Cu, I, Fe, Pb, Mn, Hg, Mo, Ni, Se and Zn) were analyzed, determined in triplicate by ICP-MS. The results obtained prove that the residues of essential and toxic elements are within the limits established by the European Union, corresponding to geographical areas of low level of exposure and/or environmental contamination. Thus, the consumption of artisanal Galician cheeses cannot be considered a source of heavy metals, their production and consumption are not a risk to public health.

Keywords: Beef cattle, cheese, contamination, essential metals, heavy metals, Pernambuco - Brazil, Spain.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades do Leite	23
---------------------------------	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa do Estado de Pernambuco e suas microrregiões.	18
Figura 2. Município de Garanhuns e sua produção na bacia leiteira do Agreste de Pernambuco.	20
Figura 3. Mapa da Espanha com suas fronteiras, rodovias e rios.	26
Figura 4. Macrorregiões da Espanha e suas comunidades autônomas.	27
Figura 5. Mapa da Espanha com a região da Galícia e sua divisão por município.	27
Figura 6. Produção de leite europeia no ano de 2018 em 1000 toneladas.	28
Figura 7. Produção de queijo europeia no ano de 2018 em 1000 toneladas.	30

LISTA DE ABREVIATURAS

Al	Alumínio
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
As	Arsênio
Ar	Argônio
°C	graus Celsius
Ca	Cálcio
Cd	Cádmio
Co	Cobalto
Cr	Cromo
Cu	Cobre
DMV	Departamento de Medicina Veterinária
Fe	Ferro
G	Unidade de aceleração
Hg	Mercúrio
HNO ₃	Ácido Nítrico
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
I	Iodo
ICP OES	Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado
K	Potássio
Km ²	quilômetros quadrados
LDMN	Laboratório de Doenças Metabólicas e Nutricionais do Centro de Estudos Avançados em Caprinos e Ovinos
Li	Lítio
Mg	Magnésio
mg/kg	miligrama por quilograma
Mn	Manganês
Mo	Molibdênio
Na	Sódio
Ni	Níquel
p	nível de significância
P	Fósforo
Pb	Chumbo

Rb	Rubídio
S	Enxofre
Se	Selênio
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
USC	Universidade de Santiago de Compostela
V	Vanádio
Zn	Zinco

SUMÁRIO

Resumo	
Abstract	
Lista de Figuras.....	11
Lista de Tabelas.....	12
Lista de Abreviaturas.....	13
1. Introdução.....	14
2. Objetivos.....	17
2.1. Objetivo Geral.....	17
2.2. Objetivos Específicos.....	17
3. Revisão de Literatura.....	18
3.1 Capítulo I – Metais essenciais e tóxicos em leite cru na bacia leiteira do Agreste Pernambucano	18
3.1.1 Caracterização do espaço amostral.....	18
3.1.2. Bacia Leiteira do Agreste Pernambucano.....	19
3.1.3. Leite Bovino.....	21
3.1.4. Metais essenciais e tóxicos.....	23
3.2. Capítulo II – Produção de queijos artesanais da região da Galícia - Espanha.....	26
3.2.1. Caracterização do espaço amostral.....	26
3.2.2. Produção de queijos artesanais.....	29
4. Referências.....	33
5. Artigos Científicos.....	41
5.1. Toxic and essential trace element concentrations in milk from the state of Pernanbuco, Brasil.....	41
5.2. Concentrations of heavy metals in Galician cheese	62
6. Memorial.....	77

1. INTRODUÇÃO

Com o crescimento demográfico, de produção, consumo e desenvolvimento industrial, muitos problemas acompanharam esse processo evolutivo, principalmente os contaminantes ambientais e de alimentos oferecidos à população humana e animal (PERES et al., 2005). Com o avanço das tecnologias do agronegócio, aumento na demanda de alimentos como carne, leite e derivados, passa-se a ter uma preocupação maior quanto ao meio ambiente, aos alimentos e aos animais (PEREIRA e MANGUALDE, 2011).

O agronegócio é considerado um dos principais componentes para o desenvolvimento e integração econômica do mundo (CAMPANHOLA, 2005). Neste segmento, a pecuária leiteira mundial no ano de 2019 alcançou a produção de mais de 513,22 bilhões de toneladas de leite, o que representou um aumento de 1,5% em relação ao ano de 2018 (505,20 bilhões de toneladas). Dentre os maiores produtores de leite, destacam-se a União Europeia, Estados Unidos e a Índia, juntos participam com cerca de 65,0% toda produção mundial. O Brasil no ano de 2019 produziu mais de 23 milhões de toneladas, ocupando a 6ª posição e contribuindo com quase 5 % da produção mundial (USDA, 2019).

Particularmente o agronegócio brasileiro é considerado uma das principais atividades econômica do país, movimentando mais de 33% do Produto Interno Bruto (PIB), sendo a pecuária uma das mais importantes e rentáveis bases para muitas cadeias produtivas, na geração de empregos, importação e exportação de produtos (VILELA et al., 2016; IBGE, 2019). Neste segmento, o Brasil é detentor de um dos maiores rebanhos bovinos do mundo, com mais de 213 milhões de cabeças, sendo o segundo maior consumidor e exportador de carne bovina (GOMES; FEIJÓ; CHIARI, 2017 e IBGE 2018). O Nordeste do país possui um rebanho de mais de 27 milhões de cabeças, tendo os estados da Bahia, Maranhão, Ceará e Pernambuco como os maiores produtores, respectivamente.

Dentro da União Europeia, a Espanha é um importante produtor de leite e queijos, atualmente o país detém um rebanho de 6.727.932 animais, sendo a região de Castilla e León como a maior produtora, com cerca de 1.501.184 animais e em segundo lugar a região da Galícia com 937.288 animais. Já com relação aos bovinos leiteiros, o país detém 815.308 animais e produção de mais de 580 milhões de toneladas de leite, além de ter a região da Galícia como o maior produtor, com cerca de 341.139 animais ordenhados (MAPA, 2018).

O leite é um componente essencial na vida dos seres humanos, é um dos alimentos mais completos da natureza, com um alto valor nutritivo, principalmente de proteína, sais minerais, gordura e vitaminas, além de ser matéria prima para a produção de alimentos industrializados.

Devendo apresentar qualidade adequada para assegurar a saúde coletiva. O leite pode conter outras substâncias além dos seus constituintes normais, dentre elas as xenobióticas (pesticidas, desinfetantes, drogas veterinárias, metais e contaminantes ambientais) contaminando o leite e seus derivados (LICATA et al., 2004).

Dentre os subprodutos do agronegócio da bovinocultura leiteira, os queijos possuem uma grande importância socioeconômica. Pode ser produzido com massa semicozida e consumido fresco ou maturado, sendo comum o emprego de leite cru para seu preparo (PEREIRA et al., 1996). São alimentos derivados do leite, ricos em proteínas, minerais, vitaminas e oligoelementos, existindo diferentes tipos de queijos a partir de diferentes tipos de leites e diferentes processos de produção (LÁCTEA BRASIL, 2006). Dentro da UE, a região da Galícia na Espanha é umas das principais produtoras de queijos artesanais, conhecidos como queijos “galegos” (oriundos da Galícia), com mais 15 milhões de toneladas produzidas no ano de 2018 (MAPA, 2018).

Animais como os bovinos, seus produtos e subprodutos, apresentam um grande potencial para serem utilizados como indicadores da contaminação ambiental, levando em consideração a proximidade de convivência, a similaridade em termos fisiológicos com o ser humano e a coincidência de *habitats* de vida (SOUZA et al., 2009). Uma destas formas de contaminação são os metais pesados, cuja ingestão acidental, aguda ou crônica pela mastigação de objetos contendo esses elementos químicos ou a partir da ingestão de água ou alimentos contaminados, pode resultar em inúmeras afecções muitas vezes imperceptíveis clinicamente ou pode levar à contaminação do leite e subprodutos (SOUZA et al., 2009).

A denominação de “metal pesado” é utilizada para designar um conjunto de metais classificados como poluentes (SOUZA et al., 2009). São considerados altamente tóxicos e representam graves riscos para a saúde humana e dos ecossistemas (SÁNCHEZ, 2008; WUANA e OKIEIMEN, 2011). Podem contaminar o solo, a água e as plantas e, por conseguinte, os animais e o próprio homem (DUARTE e PASQUAL, 2000; SWARUP e PATRA, 2005). Estes elementos podem estar presentes na camada atmosférica, resíduos agropecuários, fertilizantes, esgotos, água de irrigação, lixo urbano e os resíduos urbanos, industriais e de mineração. (SOUZA et al., 2009; BABIN-FENSKE e ANAND, 2011). Dentro da classificação dos contaminantes, os metais, principalmente os metais pesados, merecem uma maior preocupação pela sua toxicidade, acumulação e retenção no corpo humano e permanência no meio ambiente (MESQUITA, 2014).

Estudos com relação a presença de metais pesados no estado de Pernambuco já foram realizados por Marcolino (2014) e por Macedo (2019), evidenciando a contaminação do leite por tais elementos, porém não há até o presente momento uma análise quimiométrica a respeito do tema. Atrelado a isto, na região da Galícia que é considerada uma das regiões de maior produção de leite e queijos espanhóis, até o presente momento não há estudos sobre a presença de metais essenciais e tóxicos nos queijos artesanais. Desta forma, faz-se necessária a ampliação das pesquisas e o conhecimento sobre a concentração de metais essenciais e tóxicos no leite bovino e seus subprodutos (queijos artesanais), a fim de avaliar se o consumo desses produtos pode ser considerados como fatores de risco à saúde pública ou não.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar a concentração de metais essenciais e tóxicos no leite cru oriundo de vacas leiteiras criadas no Agreste do estado de Pernambuco e em queijos artesanais produzidos na região da Galícia-Espanha.

2.2. Específicos

Determinar as concentrações de Cd, Cu, Fe, Pb e Zn em amostras de leite cru de vacas leiteiras criadas no Agreste Pernambucano;

Avaliar se há influência do tipo de ordenha, presença de efluentes e proximidade da propriedade a rodovias nos níveis de Cd, Cu, Fe, Pb e Zn;

Avaliar a partir de um estudo quimiométrico a relação dos elementos Cd, Cu, Fe, Pb e Zn no leite cru das vacas criadas no Agreste Pernambucano;

Analisar as concentrações de (Pb, Cd, Zn, Ag, As, Be, Br, Co, Cu, Fe, Cr, F, Hg, Mn, Mo, Ni, Sb, Se, Sn, Ti e V) nos queijos artesanais produzidos na região da Galícia-Espanha.

3. Revisão de Literatura

3.1. Capítulo I – Metais essenciais e tóxicos em leite cru da bacia leiteira do Agreste Pernambucano

3.1.1. Caracterização do espaço amostral

O estado de Pernambuco possui cerca de 98.311 km², e é localizado no centro leste da Região Nordeste, banhado pelo Oceano Atlântico e tem a cidade do Recife como sua capital. O estado faz divisa territorial com a Paraíba, Ceará, Alagoas, Bahia e Piauí. Também faz parte do território pernambucano, o arquipélago de Fernando de Noronha, a 545 km da costa. O estado possui 185 municípios, com um total de 8.796.032 habitantes (CONDEPE/FIDEM, 2013).

Pernambuco é dividido em cinco Mesorregiões: Agreste, Metropolitana do Recife, São Francisco, Sertão e Zona da Mata (Figura 1). O Agreste pernambucano possui 71 municípios, divididos em seis microrregiões: Alto Capibaribe, Médio Capibaribe, Vale do Ipojuca, Brejo Pernambucano, Vale do Ipanema e Garanhuns (Figura 2).



Figura 1. Mapa do Estado de Pernambuco e suas microrregiões.

A região do Agreste Central de Pernambuco – abrange 26 municípios, sendo eles: Agrestina, Alagoinha, Altinho, Barra de Guabiraba, Belo Jardim, Bezerros, Bonito, Brejo da Madre de Deus, Cachoeirinha, Camocim de São Felix, Caruaru, Cupira, Gravatá, Ibirajuba, Jataúba, Lagoa dos Gatos, Panelas, Pesqueira, Poção, Riacho das Almas, Sairé, Sanharó, São

Bento do Una, São Caitano, São Joaquim do Monte e Tacaimbó (Figura 3) (CONDEPE/FIDEM, 2013).

O Agreste Meridional abrange uma área de 13.113,50 Km², composto por 26 municípios, sendo eles: Águas Belas, Angelim, Bom Conselho, Brejão, Buíque, Caetés, Calçado, Canhotinho, Capoeiras, Correntes, Garanhuns, Iati, Itaíba, Jucati, Jupi, Jurema, Lagoa do Ouro, Lajedo, Palmeirina, Paranatama, Pedra, Saloá, São João, Terezinha, Tupanatinga e Venturosa (Figura 3) (CONDEPE/FIDEM, 2013).

Estas duas regiões, tanto o agreste central quanto o meridional são caracterizadas por uma economia bastante diversificada, com as culturas anuais, perenes e de ciclo curto bem como o desenvolvimento e concentração da pecuária de leite e de corte do estado (FIGUEIROA, 2006).

3.1.2. Bacia leiteira do Agreste Pernambucano

Uma das principais características ao longo do tempo na pecuária leiteira foi a produtividade de leite vaca dia (kg /vaca/dia), porém ocorreram alguns incrementos nas características de qualidade no início do século 21, alterando o foco nos programas de melhoramento genético leiteiro (BORO et al. 2016). Na atualidade, o desafio é produzir leite em quantidade, qualidade e de forma sustentável sem contaminantes para uma população em crescimento exponencial.

O Brasil é considerado um dos maiores produtores de leite de vaca do mundo, levando em consideração informações do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (*United States Department of Agriculture* - USDA). Os maiores produtores de leite do mundo são a União Europeia, Índia, Estados Unidos e China, o Brasil ocupa atualmente a 6^o posição na produção de leite do mundo, correspondente a 5% da produção mundial. Porém, mesmo com esta produção mundial, a demanda nacional é superior, sendo o país tradicionalmente importador de leite.

Na região Nordeste do país, a produção de leite está concentrada em sua grande maioria no Sertão e no Agreste, como no caso dos sertões alagoano, cearenses, paraibano e sergipano, além do agreste pernambucano e central potiguar, regiões onde o clima é mais propício para a criação de bovinos leiteiros (REIS FILHO e SILVA, 2013).

O estado de Pernambuco ocupa a 14^a posição da produção de leite do país, tendo o estado de Minas Gerais como o maior produtor brasileiro. Já em relação a região Nordeste, o estado

ocupa a 3ª colocação na produção de leite, ficando atrás apenas dos estados da Bahia e Ceará (IBGE, 2018). Dentro do estado de Pernambuco a região a bovinocultura leiteira de Pernambuco, firmou-se historicamente no Agreste Pernambucano, mais especificamente no Agreste Meridional, tomando a cidade de Garanhuns como referência, além do Vale do Ipanema e Vale do Ipojuca localizados na região (CARVALHO et al., 2009). A atividade leiteira exerce um grande papel no Estado, com elevado potencial para produção de leite, em função de suas características socioeconômicas, tecnológicas, culturais e edafoclimáticas.

O Agreste Meridional está geograficamente localizado na Mesorregião do Agreste e do Sertão Pernambucano, correspondendo a uma de transição ou área intermediária entre a Mata e o Sertão, possui aproximadamente 13.153 km². É conhecido como bacia leiteira do Estado, por ter como uma das principais bases econômicas a pecuária leiteira, com a produção de leite e seus subprodutos de forma industrial ou artesanal (MDA, 2011).

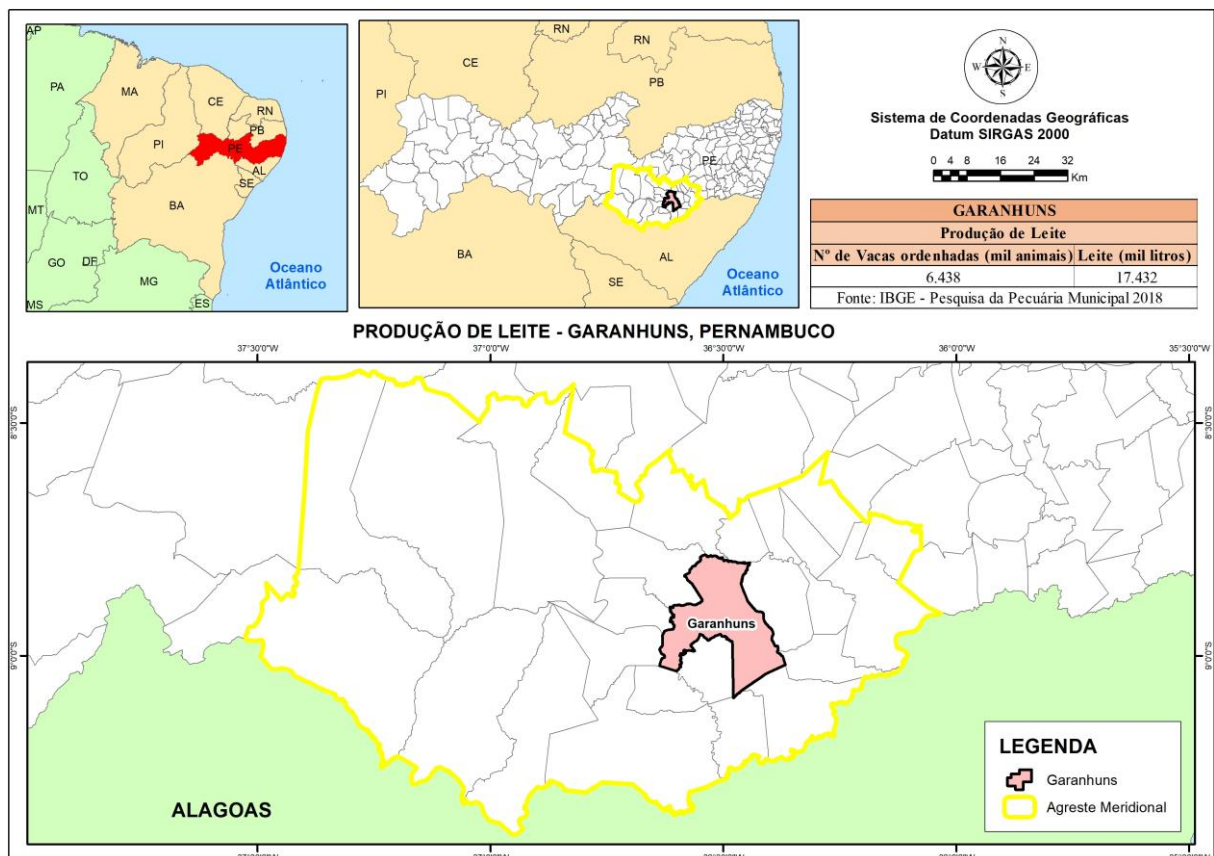


Figura 2. Município de Garanhuns e sua produção na bacia leiteira do Agreste de Pernambuco.

A produção leiteira da região do Agreste Meridional é considerada uma importante base de sustentação econômica, com produção de leite e derivados de forma artesanal e

industrial, além da geração de inúmeros empregos diretos e indiretos (CARVALHO et al., 2009). Cerca de mais de 52,3% da produção de leite é oriunda do Agreste Meridional, o que evidencia a importância da atividade na economia regional e do estado (MDA, 2011). Porém, há uma grande discrepância, com produtores que investem em tecnologia, melhoramento genético, alimentação de qualidade e quantidade correta e em outro extremo, outros produtores que desenvolvem a pecuária leiteira sem aprimoramento tecnológico (FBB; IICA, 2010).

Nesta região alguns municípios como Bom Conselho, Venturosa, Pedra, Garanhuns e principalmente Buíque concentram a maior produção de leite. De todos municípios pertencentes ao território, Garanhuns assume posição de destaque e principal cidade, por ser considerada o polo econômico ativo da região, pelas atividades industriais, do comércio, educação e do turismo (MDA, 2011).

Com relação a bacia leiteira propriamente dita, o município que apresenta uma maior produção e conseqüentemente maior importância econômica é o de Buíque, por sua dedicação a atividade da bovinocultura leiteira, correspondendo a uma produção de 75.600 mil litros de leite por dia em 2018. Já o município de Garanhuns, detém mais de 20 mil bovinos, com mais de 6 mil vacas ordenhas e uma produção de mais de 17 mil litros de leite (IBGE, 2018). Penaforte Junior et al. (2009), reforça a importância da bacia leiteira do agreste meridional por se apresentar altamente concentrada e não ter uma grande variação na produção de leite entre o período de chuva e o da seca.

3.1.3. Leite Bovino

A crescente demanda global por alimentos, principalmente por proteínas ou fontes proteicas como o leite e os produtos lácteos exige que estes sejam produzidos e comercializados de forma segura e saudável para o consumo humano. Com a ocorrência de afecções ou intoxicações alimentares em todo o mundo, aumentou exponencialmente a conscientização da sociedade em relação a segurança alimentar e a necessidade de um melhor controle de produção, dos pontos de processamento, armazenamento, transporte e venda (SOBUKOLA et al., 2009).

Leite é considerado o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de fêmeas sadias, bem alimentadas e descansadas levando em consideração o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do leite (BRASIL, 2011). Sob a ótica biológica e físico-químico, o leite é considerado um líquido composto por água,

gordura, proteína, lactose, vitaminas e minerais (NAZARIO et al., 2009), cada nutriente, unidade e valor já foi descrito por USDA (2014) e consta na Tabela 1.

Além disso, o leite é considerado uma das principais fontes de ferro nos primeiros anos de vida, além de ser de fundamental importância principalmente para dietas infantis, já que são recomendadas o consumo de ferro de 10 mg por dia dos seis aos 60 meses. O baixo consumo do leite ou a sua baixa concentração do mineral (cerca de 2,6 mg Fe para 1.000 kcal do alimento) pode acarretar uma das principais causas de anemia infantil, uma vez que esse alimento é geralmente pobre em ferro (LEVY-COSTA e MONTEIRO, 2004).

Em relação ao seu consumo, é considerado como leite de qualidade destinado ao consumo humano o que estiver dentro dos padrões estabelecidos pela Instrução Normativa 62 de 2011 (BRASIL, 2011). Dentre estes parâmetros, destaca-se a composição química, os teores de gordura, lactose, proteína e sólidos totais, características organolépticas como o sabor, odor, aparência, contagem bacteriana total (CBT) e contagem de células somáticas (CCS).

A composição do leite pode sofrer inúmeras alterações através da nutrição, de forma direta ou indireta, já que para a sua síntese são necessários vários precursores oriundos da alimentação (WITTNER, 2000). Ainda segundo o autor, quando ocorrem alterações nutricionais, o organismo passa a tentar compensar este desequilíbrio, utilizando reservas corpóreas e favorecendo o aparecimento de doenças metabólicas. Estas enfermidades podem alterar o desempenho produtivo e limitar a performance do animal de forma persistente, diminuindo a rentabilidade do produtor.

Algumas alterações da composição do leite e conseqüente contaminação estão ligadas aos metais pesados, pois estes elementos podem estar presentes em decorrência da contaminação das vacas em lactação através da exposição à poluição ambiental ou até mesmo pelo consumo de alimentação e/ou água contaminados (ABDALLAH, 2005). Além da contaminação pelo uso de defensivos agrícolas, fármacos veterinários, acidentes envolvendo contaminantes ambientais (BRASIL, 1999), ação agroquímica com a adubação efetuada de modo incorreto (RAMALHO et al. 2000). Segundo Tolonen (1995), é importante destacar que qualquer contaminação por mínima que seja detectada no leite é uma questão grave e merece toda atenção, já que este, é constituinte da alimentação infantil e importante na alimentação de outros grupos sociais com variadas faixas etárias.

Tabela 2 Propriedades do Leite

Nutriente	Unidade	Valor por 100 g
Água	G	89.92
Energia	Kcal	42
Proteína	G	3.37
Lipídios totais	G	0.97
Carboidratos, por diferença	G	4.99
Fibra dietética total	G	0.0
Açúcares totais	G	5.20
Colesterol	Mg	5
Minerais		
Ca	Mg	125
Fe	Mg	0.03
Mg	Mg	11
P	Mg	95
K	Mg	150
Na	Mg	44
Zn	Mg	0.42
Vitaminas		
Vitamina C	Mg	0.0
Tiamina	Mg	0.020
Riboflavina	Mg	0.185
Niacina	Mg	0.093
Vitamina B-6	Mg	0.037
Folato (vit. B-9)	µg	5
Vitamina B-12	µg	0.47
Vitamina A, RAE	µg	14
Vitamina A, IU	UI	47
Vitamina E (alpha- tocopherol)	Mg	0.01
Vitamina D (D2 + D3)	µg	0.0
Vitamina D	UI	1
Vitamina K	µg	0.1

Fonte: USDA

3.1.4. Metais essenciais e tóxicos

Os metais são pertencentes a um grupo de elementos químicos sólidos no seu estado puro, a exceção do mercúrio, caracterizados pelo seu brilho, condutividade de eletricidade, elevados pontos de fusão e ebulição entre outros aspectos (CARDOSO, 2008). Estes compostos são essenciais em vários processos fisiológicos e metabólicos aos organismos,

embora sejam considerados como principais poluentes e potencialmente citotóxicos, carcinogênicos e mutagênicos (DOMINGOS et al., 2005).

A denominação de “metal pesado” é utilizada para designar elementos químicos classificados como poluentes, incluindo metais, semimetais e mesmo não metais, a exemplo do selênio (FREIRE, 2005). São caracterizados com densidade superior a 5 g/cm³, dependendo da sua concentração atmosférica, na água, rochas ou sedimentos, além da forma como estão disponíveis para os seres vivos (GROSSI, 1993). Já para Cardoso (2008), os metais pesados podem ser considerados os elementos com densidade elevada, superior a 4,0 g/cm³, além de apresentarem altos valores de número atômico (acima de 20), massa específica e massa atômica. Dos metais conhecidos e listados na tabela periódica, nem todos provocam toxicidade, dos 80, apenas 30 são tóxicos para o ser humano (KLAASSEN, 1996; VRIES, 1996; KLAASSEN, 2001; AVILA-CAMPOS, 2007; AVILA-CAMPOS 2008).

Considera-se como metais tóxicos aos seres vivos o Chumbo (Pb), Cádmio (Cd), Zinco (Zn), Prata (Ag), Arsênio (As), Berílio (Be), Bromo (Br), Cobalto (Co), Cobre (Cu), Ferro (Fe), Cromo (Cr), Flúor (F), Mercúrio (Hg), Manganês (Mn), Molibdênio (Mo), Níquel (Ni), Antimônio (Sb), Selênio (Se), Estanho (Sn), Tálcio (Ti) e Vanádio (V) (CAMARGO et. al., 2001).

Segundo Grossi (1993), os metais estão distribuídos no meio ambiente e alguns deles como o zinco, magnésio, ferro e cobalto são vitais para o crescimento humano e de organismos em concentrações adequadas. Porém, alguns são nocivos e podem causar sérios transtornos à saúde humana quando em concentrações inadequadas, como por exemplo, o chumbo, mercúrio, cádmio, cromo, arsênio. Para Vullo (2003), os metais pesados causam danos irreversíveis no organismo por ter ação direta no bloqueio de atividades biológicas, inativação enzimática por formar ligações entre o metal e das proteínas.

Estes elementos são um grave risco para a saúde humana e dos ecossistemas por serem altamente tóxicos acumulativos e residuais (SÁNCHEZ, 2008; WUANA e OKIEIMEN, 2011). Para Cardoso (2008), as principais propriedades dos metais pesados, também conhecidos como elementos traço, são os elevados níveis de reatividade e bioacumulação. Caracterizando estes elementos por não desencadear diversas reações químicas, mas também por não serem metabolizáveis (degradados nos organismos vivos), permanecendo em caráter cumulativo ao longo da cadeia alimentar. De acordo com Babin-Fenske e Anand (2011), estes elementos não são facilmente degradados e podem persistir no ambiente durante anos, mesmo com a remoção das fontes de poluição, ao contrário de poluentes orgânicos. Os principais

metais pesados presentes no solo e insumos utilizados na agricultura são: Co, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Sn e Zn, sendo alguns deles essenciais às plantas e animais (Cu, Fe, Mn, Mo, Ni e Zn) e (Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo e Zn), respectivamente (ZENTENO, 2003).

Os metais são constituintes naturais do meio ambiente, ar, alimento, água e poeira, estando presentes nos solos e rochas, em muitos produtos e utensílios que manuseamos, além de surgirem de emissões industriais e automotivas. Porém, a poluição provocada pela ação antropogênica originadas da mineração, fundição, transporte, operações militares e industriais, fábricas, utilização de pesticidas e fertilizantes na agricultura comercial, podem aumentar a concentração dos metais pesados, levando à contaminação do solo, da água e das plantas e, por conseguinte, dos animais e do homem (PAOLIELLO e CHASIN, 2001; PILON-SMITS, 2005; SWARUP e PATRA, 2005; CHAFFAI e KOYAMA, 2011).

Esse grupo de elementos químicos possui uma propriedade química que os distingue em relação aos efeitos no organismo, podendo comprometer diferentes órgãos e tecidos do organismo pelos processos bioquímicos que resultam na afinidade com um ou outro órgão ou tecido. Além disso, são comumente encontrados em concentrações muito pequenas, associados a outros elementos químicos, formando minerais em rochas. (RUPPENTHAL, 2013).

A agropecuária constitui uma das mais importantes fontes não pontuais de poluição por metais. As principais fontes liberadoras de elementos como (Cd, Cr, Pb, Zn Cu, Pb, Mn, Zn Cu, Cr Cu, As, e Zn) são os fertilizantes, os pesticidas, os preservativos de madeira e dejetos de produção intensiva de bovinos, suínos e aves (KAY, 1973; PEDROSO; LIMA, 2001; SANTOS et al., 2002; COSTA, 2007;). Com isso, os metais lançados no solo decorrentes destas atividades são carregados para os rios, persistindo no meio aquático por apresentar forma livre ou iônica, facilitando a sua acumulação nos tecidos principalmente dos peixes (QUEIROZ, 2006; VINODHINI; NARAYANAN, 2008).

Segundo Flynn (1992), há uma grande variabilidade nos alimentos com relação à presença de elementos metálicos devido a fatores associados ao ambiente, práticas tecnológicas e uso de produtos químicos na agropecuária, o que tem provocado pela contaminação dos alimentos por estes compostos. De acordo com Macedo (2012), os metais pesados podem representar um grave risco à saúde dos humanos pelo contato, a médio e longo prazo, com estas substâncias, causando contaminação progressiva e cumulativa.

A presença de metais pesados em animais de produção pode ser avaliada através de várias amostras biológicas, dentre elas os pêlos, sangue, leite, fígado, rins, músculos e ossos

(RASHED e SOLTAN, 2005; REGLERO et al., 2009). A contaminação dos animais com estes elementos pode ocorrer pela ingestão de água, vegetações poluídas ou pela inalação (MIRANDA et al., 2009; VAN DER FELLS-KLERX et al., 2011).

3.2. Capítulo II – Produção de queijos artesanais da região da Galícia – Espanha.

3.3.1. Caracterização do espaço amostral

A Espanha é um país mediterrâneo em termos históricos, culturais e geográficos. Possui cerca de 504.645 km², além de apresentar uma das mais velhas e maiores populações da Europa, com aproximadamente 46.438.000 habitantes (INE, 2016). Sua localização é dividida entre a Península Ibérica, Europa meridional, ao oeste com Portugal e a nordeste com a França. O país também faz fronteiras com o Oceano Atlântico, África e Marrocos devido a inúmeros arquipélagos (Figura 3).



Figura 3. Mapa da Espanha com suas fronteiras, rodovias e rios.

Sua capital é a cidade de Madrid, localizada na zona central do país, é a cidade mais populosa além de ser o grande centro econômico espanhol, sua população estimada é de 3.200.000 habitantes em 2015, porém sua região metropolitana possui a maior aglomeração populacional nacional com cerca de 5.600.000 habitantes (INE, 2016). Várias cidades são consideradas muito importantes para o país como Barcelona, Valencia, Sevilha, Córdoba,

Zaragoza, Valladolid, além de La Coruña, Santander e Bilbao (estas últimas possuem uma destacada concentração populacional nas zonas costeiras do Atlântico).

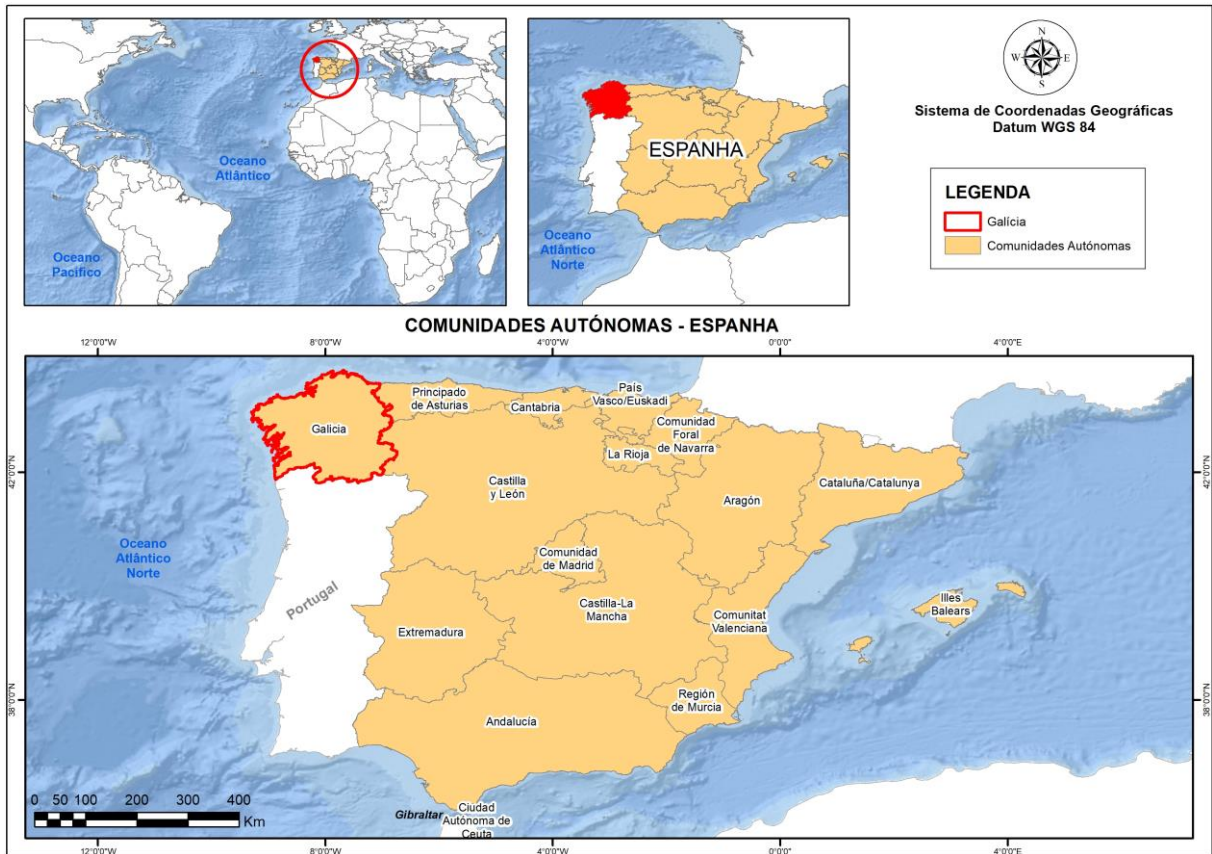


Figura 4. Macrorregiões da Espanha e suas comunidades autônomas.

A região da Galícia é uma das 17 comunidades autônomas da Espanha e abrange as províncias de Lugo, La Coruña, Pontevedra e Ourense. Seus limites geográficos são ao norte com o mar Cantábrico, oeste com o oceano Atlântico, leste com as regiões espanholas de Astúrias, Castilla e Lyon e ao sul com Portugal. A sua capital é Santiago de Compostela (Figura 4 e 5).



Figura 5. Mapa da Espanha com a região da Galícia e sua divisão por município.

Em si tratando da produção leiteira espanhola, o total de vacas destinada a esta produção é de cerca de 815.308 animais, tendo a região da galícia com a maior parte desta produção com aproximadamente 341.139 vacas leiteiras, o que corresponde a mais de 39% da produção de leite espanhol (MAPA, 2019).

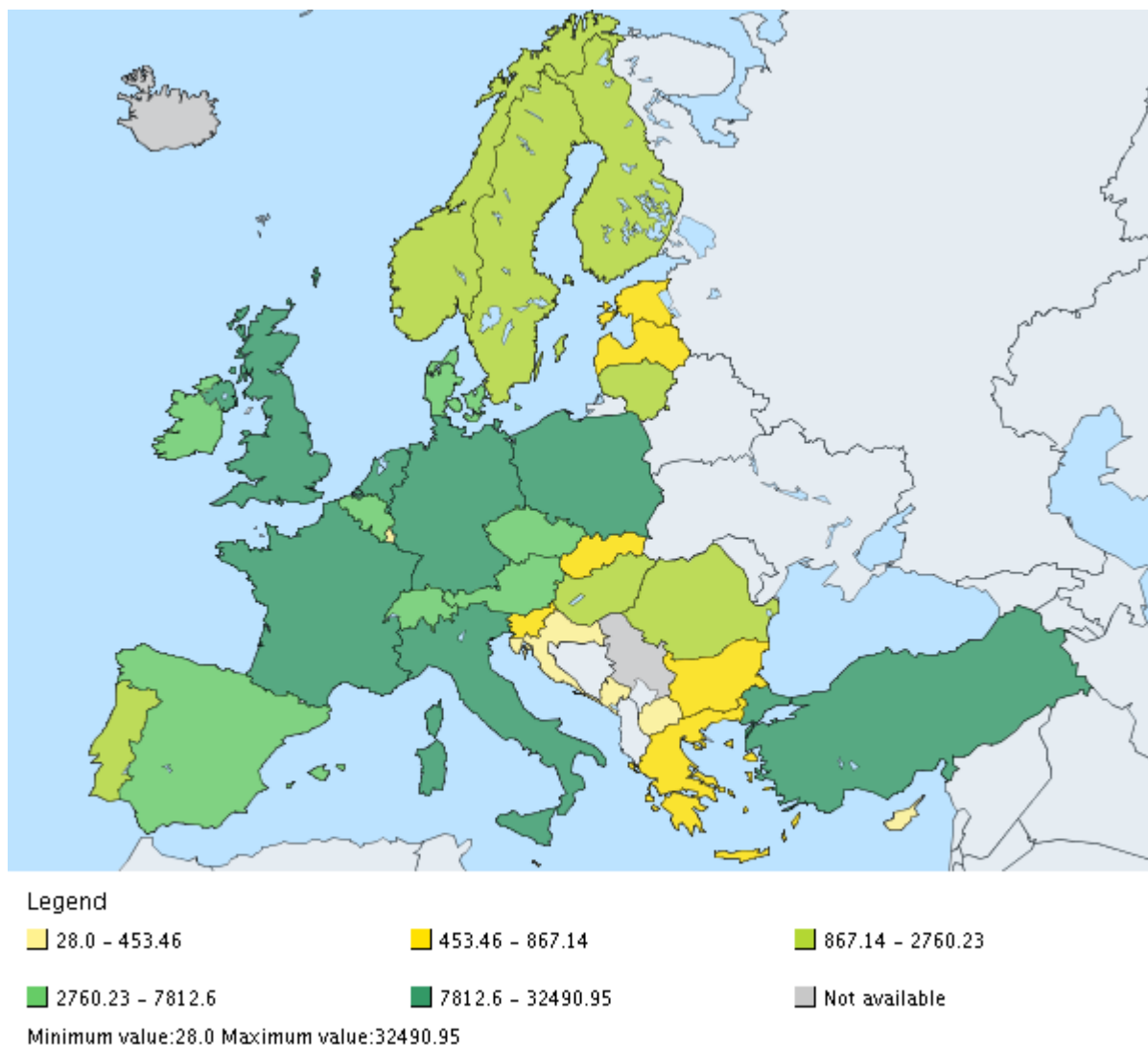


Figura 6. Produção de leite europeia no ano de 2018 em 1000 toneladas.

Fonte: Eurostat 2019.

Esta região é conhecida por sua produção e dedicação a pecuária, principalmente a leiteira e a fabricação de queijos artesanais como o Arzua-Ulloa, Cebreiro, Queixo Tetilla e San Simón da Costa. Segundo dados do MMO, a destinação do leite produzido na Espanha no de 2019 chegou a mais de 20% para a fabricação de queijos (MAPA, 2019).

3.3.2. Produção de queijos artesanais

A produção de alimentos seguros é uma das maiores preocupações mundiais relacionadas à saúde e alimentação, estando diretamente associado a características microbiológicas e higiênico-sanitárias do alimento (FREITAS FILHO et al., 2009). Segundo

Venturoso et al. (2007), é de fundamental importância o controle de qualidade de produtos lácteos para a garantia da saúde e satisfação do consumidor. Para que a qualidade desses produtos seja garantida, é de suma importância a avaliação das características físicas, químicas, microbiológicas e sensoriais.

O queijo tem sua origem de muitos séculos antes de Cristo. Sendo descoberto por um acidente. Algumas civilizações como os romanos tornaram sua fabricação uma ciência e os franceses uma arte. Já no Brasil, sua produção aconteceu por meio dos colonizadores portugueses (AQUARONE et al., 2001). Algumas outras teorias apontam o surgimento do queijo há 8.000 anos no crescente fértil entre dois rios, o Tigres e o Eufrates, onde hoje é o Iraque. Outros pesquisadores afirmam que o queijo é responsável pela nutrição humana desde a domesticação de certos animais como as vacas, cabras e ovelhas e conseqüentemente com a utilização do seu leite. Segundo relatado por Scott (1999), os primeiros fabricantes de queijos são considerados os sumérios aproximadamente a 5.000 anos a.C. e depois os egípcios a aproximadamente 1.000 anos a.C. A fabricação de queijo por pastores de Israel (atual) já foi citada no antigo testamento, nos tempos pré-cristãos (ENGELMANN e HOLLER, 2008).

Os queijos artesanais possuem várias vantagens competitivas de mercado, desde bom rendimento durante a fabricação, preços acessíveis à grande parte da população até a sua diversificação e denominações de origem. Além disso, este produto em várias regiões no mundo é considerado uma das principais fontes de renda e trabalho, principalmente para os pequenos e médios produtores rurais, que comercializam em feiras, mercados e pequenos estabelecimentos comerciais locais (ROSA et al., 2005).

Este produto é originado decorrente do processo de coagulação para sua obtenção e fabricação, sendo observado pela primeira vez, como resultado da ação de enzimas coagulantes existentes no estômago de animais herbívoros (ANDRADE, 2006). Para ser considerado como queijo, algumas características como consistência (semidura e elástica), textura, coloração, umidade e sabor devem estar presentes e seguir os padrões que são instituídos pelas Instruções Normativas e denominações de origem de cada país.

O processo de fabricação de queijos é bastante diversificado, pois seu resultado depende do tipo de leite utilizado (com tratamento térmico ou não) e metodologia empregada. Assim, podem ser produzidos tanto na escala e modo industrial, quanto artesanal (FEITOSA et al., 2003). Segundo Peixoto et al. (2007), como o queijo é fabricado de forma artesanal muitas vezes, fabricados por pessoas inexperientes tecnologicamente, a partir de leite cru e sem os devidos cuidados de higiênicos durante e após o processamento, fatores estes que

podem ser considerados como agravantes à contaminação por diversos micro-organismos e comprometer a qualidade e a saúde do consumidor. Segundo os mesmos autores, estes fatores citados não apresentam segurança microbiológica e padronização da qualidade do produto, levando a problemas de contaminação.

A Espanha é considerada um grande produtor de queijos, porém não dedica uma grande porcentagem do leite produzido para a sua fabricação se comparado a países como França, Alemanha ou Holanda (que dedicam mais da metade do leite produzido a elaboração de queijos) (Venta Queijos Galegos). Em novembro de 2019, o país produziu cerca de 15,5 mil toneladas de queijos.

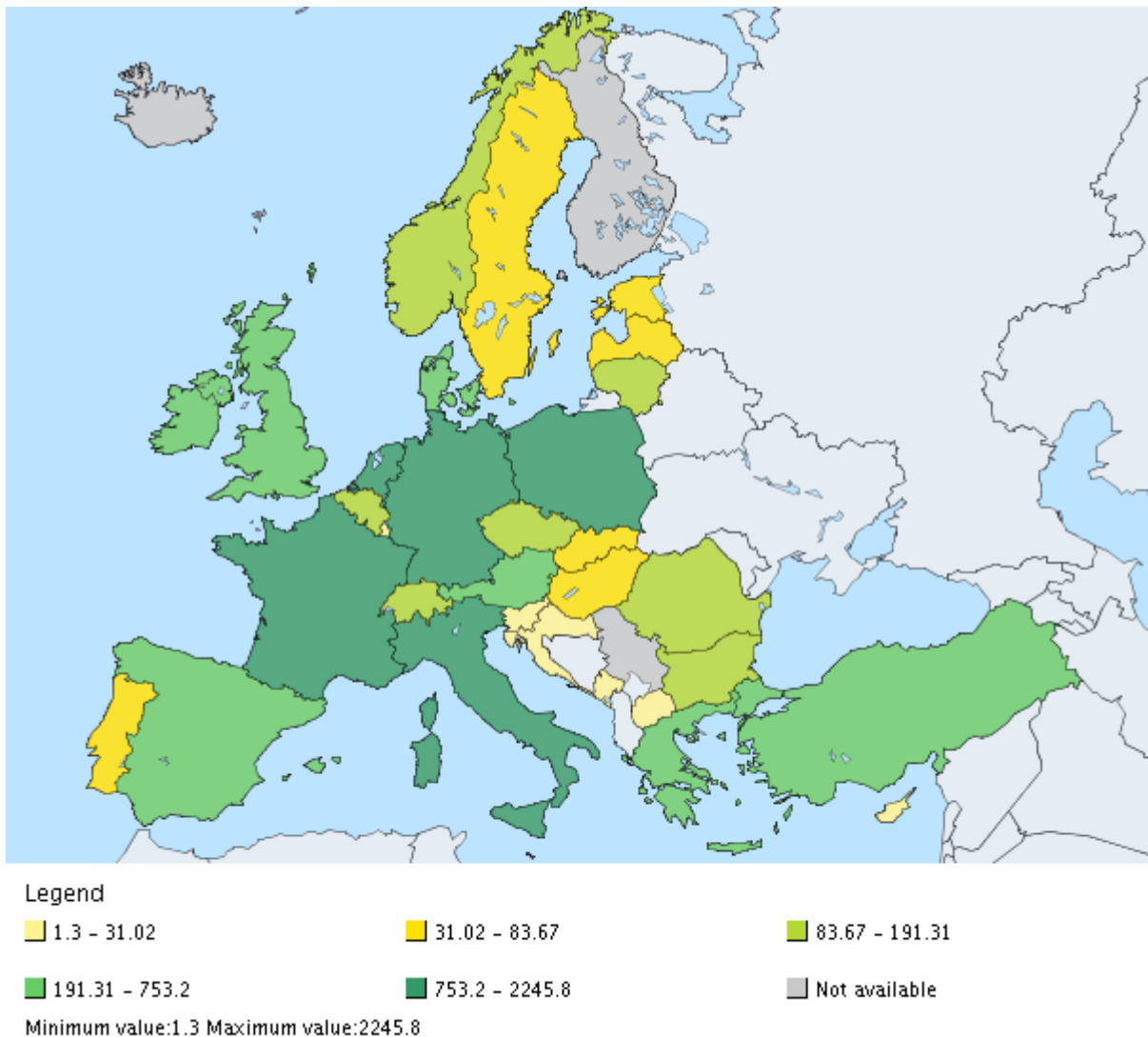


Figura 7. Produção de queijo europeia no ano de 2018 em 1000 toneladas.

Fonte: Eurostat2019.

A região da Galícia é detentora de mais de 39% da produção de leite na Espanha, junto com a região de Castilla e León (com 13%) concentram mais de 50% da produção de leite. Além disso, é a região com maior produção de queijos artesanais (MAPA, 2019).

O consumo de queijo na Espanha é muito habitual e bastante comum, quer sejam consumidos em residências, bares, hotéis ou até em eventos em instituições, sendo desde queijos nacionais a importados. A média de ingestão de queijos por pessoa e ano é um pouco superior a 6 kg, destes 1,7 kg são de queijo fresco, 2,2 kg de queijos curados e semicurados e o restante, 2,1 kg para outros tipos de queijos. Os principais consumidores de queijo per capita são os gregos com em média 23,5 Kg, os franceses com cerca de 22 Kg, os italianos com 19 Kg e os alemães com 18,2 Kg (MERCASA, 2000).

Várias consequências relacionadas ao produto e seu consumo podem ocorrer com queijos de baixa qualidade, risco de DTA e contaminações. Originadas por condições higiênico-sanitárias inadequadas da matéria prima, falhas no processamento, armazenamento, transporte, contaminação durante a comercialização ou sendo proveniente do ar, ambiente, embalagens primárias, funcionários, equipamentos e utensílios. Por isso, segundo Peixoto et al, (2007), todos estes fatores são pontos importantes que devem ser ajustados às Boas Práticas de Fabricação (BPF) de forma a não representarem risco de contaminação para o produto e aos seres humanos.

4. REFERÊNCIAS

ANDRADE, A.A. Estudo do perfil sensorial, físico-químico e aceitação de queijo de Coalho produzido no estado do Ceará. 2006. 138 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

CAMARGO, O. A.; ALLEINI, L. R. F.; CASAGRANDE, J. C.; Reação dos micronutrientes e elementos tóxicos no solo, In: FERREIRA, M. E. (Ed.). **Micronutrientes e elementos tóxicos na agricultura**. Jaboticabal: CNPq; 2001.

AQUARONE, E.; BORZONI, W.; SCHMIDELL, W. A.; LIMA, U. A. **Biotecnologia Industrial: biotecnologia na produção de alimentos**. São Paulo: Edgar Blucher, V. 4. 2001.

AVILA-CAMPOS, M.J. **Metais Pesados e Seus Efeitos**. www.mundodoquimico.hpg.com.br; 2008. Acesso em: 10 jan. 2020.

AVILA-CAMPOS, M.J. **Metais Pesados no Organismo**. www.comidavida.blogspot.com; 2007. Acesso em: 10 jan. 2020.

BABIN-FENSKE, J.; ANAND, M. Patterns of insect communities along a stress gradient following decommissioning of a Cu-Ni smelter. **Environmental Pollution**, v.159, p.3036–3043, 2011.

BORO, P. et al. Genetic and non-genetic factors affecting milk composition in dairy cows. **International Journal of Advanced Biotechnology Research**. v, 6, n. 2, p. 170-174, 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 62**. Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal – PNCR. Brasília, 2011. Disponível em <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>> Acesso em 14 jul. 2019.

CAMPANHOLA, C. Avanços na pesquisa agropecuária brasileira. **Usp, Revista**, 64, 68-75. 2005.

CARDOSO, M. L. **Metais pesados**. 2008. Disponível em: <http://www.infoescola.com/quimica/metais-pesados/>. Acesso em: 13 jan. 2020.

CARVALHO, G.R.; CARNEIRO, A.V.; YAMAGUCHI, L.C.T.; MARTINS, P.C.; HOTT, M.C.; REIS FILHO, R.J.C. e OLIVEIRA, M.A. **Competitividade da cadeia produtiva do leite em Pernambuco**. 1a ed. Juiz de Fora: Embrapa gado de Leite, 2009.

CHAFFAI, R.; KOYAMA, H. Heavy metal tolerance in Arabidopsis thaliana. **Advances in Botanical Research**, v.60, p.1–49, 2011.

CONDEPE/FIDEM, **Agência Estadual de Planejamento e Pesquisa de Pernambuco– Caderno Estatístico**, 2013. Disponível em <<http://www.bde.pe.gov.br/estruturacao geral/filtroCadernoEstatistico.aspx>> Acesso em 28 jan. 2020.

COSTA, J. R. Distribuição de metais em peixes marinhos ao longo do litoral sudeste do Brasil. 2007. 43 f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2007.

DOMINGOS, V.D., BOARO, C.S.F., CATANEO, A.C., LOBO, T.F., MARTINS, D. Efeito do cobre na atividade da enzima pirogalol peroxidase em plantas de *Myriophyllum aquaticum* cultivadas em solução nutritiva. **Planta daninha**. (23 Pt 2): p.375-380. 2005.

DUARTE, R.P.S.; PASQUAL, A. Avaliação do cádmio (Cd), chumbo (Pb), Níquel (Ni) e zinco (Zn) em solos, plantas e cabelos humanos. **Energia na Agricultura**, Botucatu, v.15, n.1, p.46-58, 2000.

EMPRESA NACIONAL MERCASA (2000): Alimentación en España 2000, Madrid, 440 pp.
ENGELMANN, B. e HOLLER P. Manual del gourmet del queso. Alemania, Quality, Servicios Globales Editores SA/H. F. Ullman. 2009.

FEITOSA T; BORGES M. F, NASSU RT; AZEVEDO, E.H.F; MUNIZ, C.R. Pesquisa de Salmonella sp., Listeria sp. e microorganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas. dez. 2003.

FIGUEIROA, J. G. **O sinal verde para a reestruturação da agroindústria do leite no agreste**. 2006. Disponível em: www.agronline.com.br/artigos/artigos.php?id=240> Acesso em: 18 jan. 2020.

FLYNN, A. Minerals and trace elements in milk. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 36, p. 209-252, 1992.

FREIRE, M.F.I. Metais Pesados e Plantas Medicinais. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, n.8, 2005.

FREITAS FILHO, J.R.; SOUZA FILHO, J.S.; OLIVEIRA, H.B.; ANGELO, J.H.B.; BEZERRA, J.D.C. Avaliação da qualidade do queijo “coalho” artesanal fabricado em Jucati – PE. **Extensio: Revista Eletrônica de Extensão**, v.6, n.8, p.35-49, 2009.

FUNDAÇÃO BANCO DO BRASIL (FBB); INSTITUTO INTERAMERICANO DE COOPERAÇÃO PARA AGRICULTURA(IICA). **Desenvolvimento Regional Sustentável - Bovinocultura de leite**. Série cade ed. Brasília: Fundação Banco do Brasil, v. 1. 2010.

GOMES, R.C.; FEIJÓ, G.L.D.; CHIARI, L. **Evolução e Qualidade da Pecuária Leiteira**. EMBRAPA Gado de Corte – Nota Técnica, p.1-4, 2017.

GROSSI, M.G.L. Avaliação da qualidade dos produtos obtidos de usinas de compostagem brasileiras de lixo doméstico através de determinação de metais pesados e substâncias orgânicas tóxicas. 1993. 222 f. Tese(Doutoramento) Instituto de Química. Universidade de São Paulo, São Paulo.

IBGE, 2018. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa da Pecuária Municipal**. Disponível em:<https://www.ibge.gov.br/estatisticas->

novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=resultados. Acesso em 08 jan. 2020.

IBGE, 2019. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Brasil em Síntese. Disponível em: <<https://brasilemsintese.ibge.gov.br/agropecuaria.html>>. Acesso em 15 jan. 2020.

KAY, K. Toxicology of Pesticides: Recent Advances. **Environmental Research**, v. 6, p. 202-243, 1973.

KLAASSEN, Curtis D.; **Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons**. Fifth Edition; McGraw-Hill; 91-109; 691-696; 699-712; USA; 1996.

KLAASSEN, Curtis D.; **Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons**. Sixth Edition; McGraw-Hill; 812-837; USA; 2001.

LÁCTEA BRASIL. **Queijo: Alimento nobre e saudável**. Julho de 2006.

LEVY-COSTA, R. B., MONTEIRO, C. A.. Consumo de leite de vaca e anemia na infância no Município de São Paulo. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 38, n. 6, Dec. 2004. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89102004000600007>>. Acesso em 14 jan. 2020.

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

MACEDO, A.T.M. Análise epidemiológica da presença de metais no soro sanguíneo e leite cru de vacas leiteiras do estado de Pernambuco, Brasil. 2019. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (PPGMV) da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

MACEDO, R. B. **Segurança, saúde, higiene e medicina do trabalho**. Curitiba, PR: IESDE Brasil, 2012.

MAPA, 2018. Declaraciones obligatorias del sector vacuno de leche. https://www.fega.es/sites/default/files/Fega_Declarac_Lacteo_Vacuno_2018_12.pdf?token=j1-elSTr

MARCOLINO, G.V. Detecção de metais pesados em leite integral cru de vacas criadas no Agreste Meridional do estado de Pernambuco. Garanhuns, 2014. 48p. Dissertação (Mestrado em Sanidade e Reprodução de Ruminantes da Universidade Federal Rural de Pernambuco).

MESQUITA, G. M. Metodologias de preparo de amostras e quantificação de metais pesados em sedimentos do Ribeirão Samambaia, Catalão-GO, empregando Espectrometria de Absorção Atômica. 2014. 120f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Goiás, Campus Catalão, Departamento de Química, 2014.

MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO AGRÁRIO-MDA. **Plano Territorial de Desenvolvimento Rural Sustentável do Agreste Meridional de Pernambuco**, 2011.

MIRANDA, M.; BENEDITO, J. L.; BLANCO-PENEDO, I.; LOPEZ-LAMAS, C.; MERINO, A.; LOPEZ-ALONSO, M. Metal accumulation in cattle raised in a serpentine-soil area: relationship between metal concentrations in soil, forage and animal tissues. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v.23, p.231–238, 2009.

NAZARIO, S. L. S., ISEPON, J.S., BUIOCHI, F., ADAMOWSKI, J. C., KITANO, C., HIGUTI, R.T.. Caracterização de leite bovino utilizando ultra-som e redes neurais artificiais. **Sba Controle & Automação**, Natal, v. 20, n. 4, Dec. 2009.

PAOLIELLO, M. M. B. CHASIN, A. A. M. Ecotoxicologia do chumbo e seus compostos. Salvador: CRA, 144p. (Cadernos de referência ambiental, v. 3). 2001.

PEDROZO; M. F. M.; LIMA, I. V. Ecotoxicologia do cobre e seus compostos. Salvador: CRA, 128 p. 2001.

PEIXOTO, N.C. Prevenção dos efeitos tóxicos do cloreto de mercúrio em ratos jovens pelo cloreto de zinco: papel metalotioneínas. Santa Maria, 2006. Tese (Doutorado em Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria).

PENAFORTE JÚNIOR, M.A.; BORGES, J.M.; AZEVEDO, D.S. e BORGES FILHO, E.L. Perfil dos produtores de leite no município de Garanhuns. In: **IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão**. Recife. Recife: UFRPE; 2009.

PEREIRA, V.V.; MANGUALDE, R.M. A rotulagem ambiental no agronegócio. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v.4, n.2, p.267-276, 2011.

PERES F., OLIVEIRA-SILVA J. J., DELLA-ROSA H. V. e LUCCA S. R. Desafios ao estudo da contaminação humana e ambiental por agrotóxicos. **Ciência saúde coletiva**. vol. 10 suppl.0 Rio de Janeiro. 2005.

PILON-SMITS, E. Phytoremediation. **Annual Review of Plant Biology**, v.56, p.15–39, 2005.

QUEIROZ, M. T. A. Bioacumulação de metais pesados no Rio Piracicaba, Minas Gerais, aplicando a análise por ativação Neutrônica Instrumental. 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia Industrial) – Centro Universitário do Leste de Minas Gerais, Coronel Fabriciano, 2006.

RAMALHO, J.F.G.P.; AMARAL SOBRINHO, N.M.B.D. e VELLOSO, A.C.X. Contaminação da microbacia de Caetés com metais pesados pelo uso de agroquímicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.7, p.1289-1303, 2000.

RASHED, M.; SOLTAN, M. Animal hair as biological indicator for heavy metal pollution in urban and rural areas. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.110, p.41–53, 2005.

REGLERO, M. M., TAGGART, M. A., MONSALVE-GONZÁLEZ, L., & MATEO, R. Heavy metal exposure in large game from a lead mining area: effects on oxidative stress and fatty acid composition in liver. **Environmental Pollution**, v.157, p.1388–1395, 2009.

REIS FILHO, R.J.C. e SILVA, R.G.D.A. **Cenários para o leite e derivados na Região Nordeste em 2020**. Recife- PE: SEBRAE, 2013.

ROSA, V.P., PORTO, E., SPOTO, M.H.F. Avaliação Microbiológica e Sensorial de Queijos Minas Frescal Embalados sob Atmosfera Modificada. **Revista Higiene Alimentar**. 19(132):58- 64. 2005.

RUPPENTHAL, Janis Elisa. Toxicologia / Janis Elisa Ruppenthal. – Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, Colégio Técnico Industrial de Santa Maria ; Rede e-Tec Brasil, 128 p. 2013.

SÁNCHEZ, M.L. **Causes and effects of heavy metal pollution**. 1ª ed. New York: Nova, 2008.

SANTOS, A.; ALONSO, E.; CALLEJÓN, M.; JIMÉNEZ, J. C. Distribution of Zn, Cd, Pb and Cu metals in groundwater of the guadiamar river basin. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 134, p. 275-286, 2002.

SCOTT, R. **Cheesemaking practice**. Tercera edición, Maryland, EUA, ASPEN Publishers Inc. 1999.

SOUZA, M. V.; VIANNA, M. W. S.; ZANDIM, B. M.; FERNANDES, R. B. A.; FONTES, M. P. F. Metais pesados em amostras biológicas de bovinos. **Ciência Rural**, v. 39, n. 6, p. 1774–1781, 2009.

SWARUP, D.; PATRA, R.C. Blood lead levels in lactating cows reared around polluted localities; transfer of lead into milk. **Science Total Environment**, v. 347, p. 106–110, 2005.

TOLONEN, M. **Vitaminas y minerales en la salud y La nutrición**. Espanha: Zaragoza, 278 p. 1995.

USDA, United States Department of Agriculture, National Nutrient Database for Standard Reference. **Release 26 - Basic Report:** 01175, Milk, fluid. Disponível em: <<http://ndb.nal.usda.gov/ndb>>.

VAN DER FELSKLERX, I.; RÖMKENS, P.; FRANZ, E.; VAN RAAMSDONK, L. Modeling cadmium in the feed chain and cattle organs. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**, v.15, p.53–59, 2011.

VENTUROSOS, R.C.; ALMEIDA, K.E.; RODRIGUES, A. M.; DRAMIN, M.R. e OLIVEIRA, M.N. Determinação da composição físico-química de produtos lácteos: estudo exploratório de comparação dos resultados obtidos por metodologia oficial e por ultrassom. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. 43(4), 601-613. 2007.

VINODHINI, R.; NARAYANAN, M. Bioaccumulation of heavy metals in organs of fresh water fish *Cyprinus carpio* (Common carp). **Intitute Journal Environment Science Technology**, v. 5, n. 2, p. 179-182, 2008.

VRIES, John. **Food Safety and Toxicity**. CRC; 133-140; USA; 1996.

VULLO, D.L. Microorganismo y metais pesados: Una intercción en beneficio del médio ambiente. **Química Viva**. 2003.

WITWER, F. Diagnósticos dos desequilíbrios metabólicos de energia em rebanhos bovinos. In: GONZÁLEZ, F.H.D.; BARCELLOS, J.O; OSPINA, H.; RIBEIRO, L.A.O. **Perfil Metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais**. Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000.

WUANA, R. A.; OKIEIMEN, F. E. Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *ISRN Ecology*, p.1–20, 2011.

ZENTENO, M.D.R. Caracterização das formas de metais pesados, biodisponibilidade e suas dinâmicas de adsorção e de mobilidade em solos do equador. 2003. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, MG.

5. Artigos Científicos

5.1. Toxic and essential trace element concentrations in milk from the state of Pernambuco, Brasil.

ABSTRACT. - he objective of the study was detecting of presence or absence of essential and toxic metals in the raw milk of cows coming from the Agreste region of the State of Pernambuco. 147 samples were collected of raw milk from dairy cows from 14 farms in the semiarid region of Pernambuco State were subjected to microwave digestion. Then the Lead (Pb), Cadmium (Cd), Copper (Cu), zinc (Zn) and iron (Fe) metals were determined by atomic emission spectrometry with inductively coupled plasma (ICP-OES). The samples were analyzed in duplicate and the results averaged and expressed in mg / L. It was possible to determine the presence of metals Pb (0,0431 mg/L), Cd (0,0069 mg/L), Zn (0,6212 mg/L), Cu (0,0195 mg/L) and Fe (0,0545 mg/L) in the raw milk of cows from the semiarid of the State of Pernambuco, with Pb as the heavy metal present at levels above the tolerance limit established by ANVISA (National Health Surveillance Agency). Being attributed the proximity with highways and environmental contamination.

Keywords: Bovine milk, contamination, heave metals, public health, toxicology.

RESUMO. - O objetivo do estudo foi detectar a presença ou ausência de metais essenciais e tóxicos no leite cru de vacas provenientes do Agreste Meridional do estado de Pernambuco. Foram coletadas 147 amostras de leite cru de vacas leiteiras de 14 fazendas da região do Agreste Meridional de Pernambuco, e submetidas à digestão por microondas. Em seguida, os metais chumbo (Pb), cádmio (Cd), cobre (Cu), zinco (Zn) e ferro (Fe) foram determinados por espectrometria de emissão atômica indutivamente acoplado ao plasma (ICP-OES). As amostras foram analisadas em duplicata e os resultados médios e expressos em mg / L. Foi possível determinar a presença de metais Pb (0,0431 mg/L), Cd (0,0069 mg/L), Zn (0,6212 mg/L), Cu (0,0195 mg/L) e Fe (0,0545 mg/L) no leite cru de vacas do semiárido pernambucano, com o Pb como metal pesado presente em níveis acima do limite de tolerância estabelecido pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Atribui-se a proximidade com rodovias e contaminação ambiental.

Palavras-chave: Contaminação, leite bovino, metais pesados, saúde pública, toxicologia.

1. Introduction

Milk is considered a complete food, because it has proteins, fats, minerals, vitamins, water and other components. Along with dairy products are very important, beneficial and nutritious foods as they contain essential nutrients for growth, bone development, immune and physiological functions of the body, it is recommended to consume them regularly, especially in children (KIRA and MAIO, 2004; PATRA et al., 2008; QIN et al., 2009; GARBA; ABDULLAHI; ABDULLAHI, 2018). Milk components can be influenced by the animal's type of food, water consumption, management, genetics and race (BRITO and

BRITO, 2001). Besides the means of manufacture, packaging, storage and environment (ENB et al 2009). Particularly milk minerals are important because of their nutritional and toxicological relevance to human and animal health (ATARO et al., 2008). The milk is an ideal source of macro and microelements such as Ca, K, P, Mn, Cu, Fe, Se and Zn, however heavy metals such as Pb, Cd, Cr, Ni and Co can be found (SIKIRIC et al. 2003; ENB et al 2009).

Historically, milk consumption by Brazilians fluctuates (decreases and increases) a lot per year, but in recent years is increasing, even with the difficulties with inflation and the reduction of real income (IBGE, 2016). Based on the forecast by the Federation of Industries of the State of São Paulo (Fiesp) (2016), milk consumption will be 198 liters/person/year in 2026, below the WHO recommendation of 220 liters/person/year.

In Brazil, control of the amount of contaminant residues in food of plant and animal origin, as well as monitoring the presence of residues of chemicals that may cause harm to the consumer's health, including organic and inorganic contaminants, are the responsibility of the Ministry of Livestock and (MAPA) and the National Plan for the Control of Residues and Contaminants (PNCRC), respectively. In addition to the inspection carried out using CONAMA Resolution 420/2009 (National Environmental Council), normative instruction 51, federal sanitary legislation on milk production and resolution no. 42.

In recent years, anthropogenic contamination has increased significantly due to accumulation and contamination by heavy metals in soils, food production and water, causing direct impacts on human and animal health. These toxic elements may influence depending on their soil concentration, availability and incorporation capacity (BEACH et al., 2008). França et al. (2017), points out that these contaminations in urban areas linked to anthropogenic activities, result in the emission of several pollutants into the environment.

The emissions of some of these elements are consequences of the traffic and particles of soot emitted by the vehicles (CARDOSO et al., 2017). According to Almeida et al. (2016) and Antunes et al. (Mn, Zn, Cu, Fe, Mg and Pb in ethanol) and Zn, Cu, Pb and Cd in gasoline. According to Cumpra-se (2004), in Brazil the use of tetraethyl lead in gasoline is prohibited by Law 2389/99. There is a worldwide concern to establish measures to reduce and / or eliminate Pb and Cd levels in food, since they are the main source of these contaminants, due to the high toxicity of these elements, even at very low levels (OKADA et al., 1997).

Heavy metals can cause serious health problems such as immune changes, nervous system disorders, kidney failure, mutations, cancers, as well as neurological, cardiovascular

and infertility disorders (AAZAMI et al., 2017). In view of the above, the objective was to study the concentration of essential and toxic metals in the bovine milk produced in the southern region of Pernambuco, evaluating the degree of contamination of the milk, the importance of these sources of contamination and the adequacy of the same to sanitary legislation. In addition, this is the first paper reporting the chemometric results of essential and toxic metals in bovine raw milk, serving as a scientific reference.

2. Material and Methods

2.1. Sample collection

Milk samples analyzed in this study were from September to December 2013, where 147 dairy cows from 14 farms located in the Agreste mesoregion of the State of Pernambuco, Garanhuns microregion, were used in an extensive and semi-intensive breeding system. A total of 147 samples of raw milk (15 ml) of cows were collected in the initial third of lactation (11 to 100 days postpartum) during milking in a sterile plastic container with a 15 ml Falcon cap, (4 ° C) and sent to the Laboratory of Clinical Pathology of the Garanhuns Cattle Clinic - UFRPE, where they were later stored in a freezer (-20 ° C).

2.2. Reagents and standard solutions

All solutions were prepared by using ultrapure water of resistance 18 MX cm₁ obtained from a Milli-Q purification system (Millipore Corp., Bedford, MA). Stock standard solutions of the elements (1000 mg/L) were of ultrapure grade: ICP Multi element standard solution IV certiPUR_ for Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb and Zn; Se ICP standard certiPUR_ for Se and Hg ICP standard certiPUR_ for Hg were purchased from Merck (Poole, U.K.). Nitric acid (69%) was from Merck (Poole, U.K.).

2.3. Sample analysis

The procedure for microwave assisted digestion was carried out at the Research Support Center (CENAPESQ) of the Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), in accordance with the protocol defined by Santos et al (2005), where each sample of raw bovine milk ml) was placed in a flask with 10 ml of HNO₃ and digested in the microwave model

MarsXpress - CEM Technology Inside for 28 minutes (step 1: 110° C - 8 min, step 2: 170° C - 10 min, step 3: 170° C - 10 min.) The samples were then filtered on pyramid-folded filter paper (weight 80g / m² filtration rate 20-25 seconds) into a new sterile Falcon tube.

The metals Pb, Cd, Cu, Zn and Fe were determined by atomic emission spectrometry with inductively coupled plasma (ICP-OES) Optima 7000 DV. The determination of the heavy metals was carried out at the Laboratory of Soil Chemistry (DEPA) of UFRPE. The samples were analyzed in duplicate, the calculated mean and the results expressed in mg / L.

An analytical quality control program was applied throughout the study. Blank values were run alongside samples and subtracted from the sample readings before the results were calculated. The limits of detection (LoD) in the acid digest were calculated as three times the standard deviation of the reagent blanks and were 0.012 (Cd), 0.14 (Cu), 0.85 (Fe), 0.036 (Pb) and 0.93 (Zn) µg/L; all samples had trace element concentrations above these LoD. To check the accuracy of the analytical method, multi-element standard solutions were used for calibration and run within the samples. The precision of the method was expressed as % of recoveries, being in all cases within acceptable ranges (90% to 110%), with a standard deviation (SD) of the recoveries < 0.010, and with a relative standard deviation (RSD) < 10%.

2.4. Statistical analysis

Normal distribution of data was checked using the Kolmogorov Smirnov test; datasets were not normally distributed and were therefore log-transformed before analysis and data presented as geometric means. A General Lineal Model (GLM) was used to evaluate the effect of the proximity of the farm of main roads (O: non; 1: yes); effluents (O: non; 1: yes); and type of milking (0: automatic, 1: manual) and their interactions on the toxic and essential trace metal concentrations in milk. The statistical procedures were performed by using IBM SPSS for Windows v.21 (International Business Machines Co.) and differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

For chemometric study, data from this work were arranged in a data matrix $X_{142 \times 5}$, in which the files corresponded to the 142 milk samples analyzed, while the columns were composed of the five variables determined, the concentrations of the mineral elements (Pb, Cd, Cu, Fe, and Zn). Prior to apply any chemometric method, and with the aim of avoiding the influence of the different size of the variables, the X matrix was autoscaled. This procedure consists in producing new variables by subtracting to each value the mean of the

variable and dividing it by the variable standard deviation. This action results in a set of new variables with zero mean and unit variance, all of them with the same size (MASSART, VANDEGINSTE, DEMING, MICHOTTE, and KAUFMAN, 1988).

Two different multivariate unsupervised chemometric techniques were employed in this work. Principal component analysis (PCA) was used to display the information contained in the data in a reduced dimension with minimum loss of data variance. The aim of this analysis is to reveal the different structures residing in the data and also to evaluate the relationship between samples and variables. Hierarchical cluster analysis (HCA) is other unsupervised display chemometric technique, commonly employed in a complementary way with PCA. HCA establishes clusters of samples (or variables) on the basis of a distance measure between them in the multidimensional space (5-dimension space, in the case at hand) (MASSART and KAUFFMAN, 1983). All chemometric techniques were carried out using Statgraphics Centurion XVI v.16.1.15 (STATPOINT TECHNOLOGIES, Inc.).

3. Results and discussion

3.1. Toxic and essential trace element concentrations in milk

The results of the toxic and essential trace element concentrations in milk in this study are presented in Table 1. Mean cadmium and lead concentrations were 0.0069 and 0,0431 mg/L respectively. These values, particularly for lead, are high when compared with other recent studies from relatively unpolluted areas but comparable with data from polluted regions, for example in India for Swarup et al. (2005), when evaluating some elements in raw cow milk, reported high Pb levels in areas close to the Zn and Pb processing industry, smelting of these metals and Al, due to the consumption of metal contaminated pastures. Still in India, Mahajan et al. (2012) investigated the influence of Hg on lactating cows raised near a thermoelectric power plant, concluding that there is an interference of proximity in the animals' milk, being its concentrations higher compared to the animals of the control group.

The Resolution - RDC No. 42 of August 29, 2013, provides for the MERCOSUR Technical Regulation on Maximum Limits of Inorganic Contaminants in Foods. With the limit of Pb and Cd in mg / kg are 0.02 and 0.05 (ANVISA), respectively as the maximum concentrations in ready-to-drink milk and milk products without addition, dilution or concentration. Statutory limit established by the European Union: 0.02 µg/L; EC, 2006.

On the contrary, when considering the trace elements, the mean copper (0,0195 mg/L), iron (0,0545 mg/L) and zinc (0,6212 mg/L) were generally lower than in other studies and could be considered within the deficient range for cow milk range according to Puls (Cu: 10-20 mg/L; Fe: <0.2 mg/L; Zn: 0.5 mg/L). There are indications that the relationship between the concentrations of milk and serum elements that may justify the deficiency or more marginal levels. According to Tokarnia et al. (2000), mineral deficiencies are related to geographical areas and when accentuated, can cause economic losses and the population dependent on cattle raising. Deficiencies can occur severely or mildly, ranging from major changes or disorders in the body to retarded growth, reproductive problems, low carcass yield, low mineral concentration and poor milk production.

Bomjardim et al. (2015), when assessing mineral deficiencies in lactating cows in the dairy, found that cows had deficiencies associated with mineral supplementation, thus even animals with mineral supplementation (inadequate or not meeting the needs), may show clinical signs and lower element concentrations.

3.2. Effect of proximity to main roads, effluents and type of milking on toxic and trace element concentrations in milk

The results of the general lineal model to evaluate the effect of proximity of the farm to main roads, effluents and the type of milking (manual or automatic) on the toxic and trace element concentrations in milk are presented in Table 2. Proximity of the farm to main roads was the main factor, exerting a significant effect on the lead, cadmium and copper concentrations in milk, that were 60, 94 and 32 % higher in the samples from farms closer to main roads (Figure 1).

The influence of the proximity to main roads on the lead accumulation in milk (MARCOLINO, 2014) or other food the concentration of heavy metals, such as Pb in different types of food (milk and rice for example), has been evidenced in several places and countries (CAGGIANO et al., 2005). In addition, the Pb and Cd have already been identified in edible vegetables as potential health risks associated with other metals (KHAN et al., 2008, VITTORI ANTISARI et al., 2015), is well documented in the literature. According to Kheir et al. (2014), high concentrations of heavy metals can be found in soils near roads / highways, which is considered the third most important factor regarding the accumulation of heavy metals in soils near cities or waste disposal areas. Industrial areas and vehicle emissions are

considered as the first and second major source of heavy metals in the environment (PENG et al., 2017).

The presence of effluents was also a significant factor for copper, but curiously, the milk samples from farms in the area of influence of effluents showed lower (23%) copper concentrations compared to those from farms not affected by effluents. No significant interactions were found between presence of effluents and proximity to roads, and both milk samples from farms close or far to main roads showed lower copper concentrations when were close to effluents. These results suggest that other factors/ trace elements present in the effluents could have a negative interaction with the copper metabolism in the animal, leading to a significant reduction of the copper concentration in the milk.

Well known are the complex non-competitive negative interactions between copper, sulphur and molybdenum in ruminants (SUTTLE, 1991) and the competitive interactions with Cd and Zn for the metallothionein binding sites (SUTTLE, 1991). Other interactions between copper and arsenic (LÓPEZ-ALONSO et al., 2002) and copper and lead (LÓPEZ-ALONSO et al., 2004) had also been described in cattle. Sometimes these interactions are difficult to interpret since they depend on the chemical form and relative concentrations of the elements in the environment can involve more than 2 elements (LÓPEZ-ALONSO et al., 2004).

Chemometric analysis: PCA and HCA

The chemometric approach more thoroughly explores large sets of data, allowing to see complex interactions among variables that may not be detected with basic statistics. As previously stated, the study of the latent structures and relationships (between samples and between variables) residing in a data matrix is commonly carried out by means of two display chemometric techniques: PCA and HCA.

In this case, PCA was used for the primary evaluation of the 5-dimension data set. PCA transforms the autoscaled data matrix $X_{142 \times 5}$ into a product of two matrices, the first one, the score matrix $S_{145 \times PC}$, includes information about the samples; while the second, the loadings matrix $L_{PC \times PC}$, encloses information related to the variables. When the number of principal components selected is smaller than the number of original variables, PCA produces a visualization of the data matrix in a reduced dimension, simplifies the original problem and allows for the examination of relation between samples and between variables through score and loadings plots, respectively (JOLIFFE, 1986).

In the present study, once PCA was applied to the original autoscaled $X_{142 \times 5}$ matrix, the first two PCs were considered enough for representing total data. As it can be seen in Table 3, the two principal components achieved for a 75.38% of the total variance explained, and the remaining PCs presented eigenvalues < 1 , indicating poor information content. This permitted the evaluation of the whole data set by using a 2D-score (or loading) plot, where the samples (or variables) are represented in the space defined by the first two principal components.

When the scores of the samples were examined in this plot (Figure 2), interesting results were afforded. A natural separation of the samples in two groups according to the nearness of the livestock exploitation to highways and roads is clearly detected (Figure 2a). This fact implies an evident influence of the traffic emissions in the metal content of the milk. Despite this “natural” separation between these two classes, it is also evident that there is certain overlapping between the two categories in the 5-multidimensional space of the variables, as it becomes clear by the score-plot.

The same separation in groups of samples has not been detected for the other two factors studied, presence or absence of effluents in the vicinity of the exploitation (See Figure 2b) and milking system (data not shown). These results are consistent with those previously presented when a general lineal model was applied to evaluate the effect of the three considered factors such as type of milking, proximity of main roads and effluents, and it confirm the vicinity of highways and roads as the more significant factor affecting the concentration of metals in milk samples. The fact that presence/absence of effluents in the proximity of the farms does not performed separated groups, and all they appeared randomly mixed showing no significant influence of this factor in the metal content studied, could indicate that other elements not determined in our study could exert the negative interaction with copper.

In order to study the relationship between variables in the whole data set, a PCA-biplot was constructed. In the biplots produced by PCA both samples and variables of multivariate data are presented in the same graphic (through their scores and loadings). Therefore, this type of plot permits to reveal and discover the relations of the variables between them and also with the samples or groups of samples. In the case at hand, the 2D-biplot obtained (Figure 3) showed: (i) a high degree of correlation of the three essential trace elements, Fe, Cu and Zn, with a potential common origin, (ii) also an important association between toxic trace elements, Pb and Cd, also with a possible shared origin. The source in this case is probably

from the emissions of motor vehicles from highways and main roads because, as it can be seen in the biplot, the axis corresponding to these two variables are coincident with the direction of the multidimensional space in which are located the milk samples from farms near highways and roads.

The second step of chemometric analysis consisted in the use of HCA. This unsupervised chemometric procedure search for groups of samples (or variables) in the multidimensional space. It is based in an algorithm that arranges similar samples (or variables) into groups called *clusters*. The similarity between objects is calculated on the basis of the distance distance that separates them, under the idea that near samples in the 5-dimensional space of the variables, they will be very similar between them. In the present case, the similarity was measured on the basis of the squared Euclidean distance, and the Ward method was used as agglomerative algorithm procedure for obtaining clusters (MASSART and KAUFFMAN, 1983). The dendrogram of the milk samples obtained when HCA was applied to the complete data set in the autoscaled $X_{146 \times 5}$ matrix can be seen in Figure 4.

Observation of the dendrogram reveals the presence of two clusters of milk samples in the space of 5-dimensions defined by the metal variables. The first cluster (coded as A) is composed of by samples belonging to farms away from main communication routes, while the second one (named B) includes mostly of samples from farms near highways and main routes. The presence of samples near roads in cluster A as well as the appearance of samples far of roads in cluster B demonstrate a certain overlapping between clusters previously pointed out by PCA. This separation in two clear groups does not have place neither for the milking type nor for the effluent factors.

Thus, this fact confirms the conclusion obtained from PCA that the most significant factor affecting the metal content of the samples is the traffic in the proximity of livestock exploitations. Moreover, Figure 4 also shows that milk samples from farms far away traffic roads showed a higher similarity as a group than the milk samples from farms near to traffic roads. This was an expected result since the distance of the farm to the road was variable. According to Salgado (2003), milk and its derivatives may have varying concentrations of lead, depending on the animal's exposure to metal, absorption and / or ingestion.

Important for public health, as contamination may occur through ingestion of animal products and by-products contaminated by the element. Bentonite is considered a technological process used in the clarification and protein stabilization of must and white

wines, this procedure is identified as one of the main sources of mineral contamination (GÓMEZ et al., 2004; NICOLINI et al., 2004; CATARINO et al., 2008). Elements such as Pb, Cd, Mo, Co, Fe among others have already been quantified after this procedure, which shows contamination (CATARINO, 2006 and CATARINO et al., 2007).

Additionally, HCA was applied to evaluate associations between variables, and also in this case two clusters of variables were detected (Figure 5), the first one included toxic metals Pb and Cd, while the second is composed of the essential trace elements. The variable arrangement showed can be directly linked with the differences in these metals according to the presence or absence of main road in the proximity of the farm in which the milk sample was collected.

From the left to the right metals are ordinated on the basis of their capability to distinguish among samples near and far from main roads. As it can be seen, the variables in the first cluster (Cd and Pb) presented clearly different levels for samples on the basis of road factor (with higher levels for exploitation near main roads). Cu exhibited also certain differences for the two classes, but with lower discrimination ability, while Fe and Zn showed similar or equal ranges. These results are in agreement with those achieved when the general lineal model was considered for testing the effect of the road factor in the metal content of milk samples.

Conclusions

It was possible to determine the presence of metals Lead, Cadmium, Zinc, Copper and Iron in raw milk of cows coming from the southern Wasteland of Pernambuco State, taking the lead as the heavy metal present at levels above the tolerance limit established by ANVISA. Attributing this fact, the proximity to the highways, since the highest concentrations were evidenced in the samples in the most fenced properties of highways. This study is the first work that addresses the results through chemometric analysis of essential and toxic metals in bovine raw milk, and since then, scientific reference.

Taking in to account the findings of the present study, the concentrations of essential and toxic metals above that allowed by the legislation can be considered risk factors to public health.

REFERENCES

AKPOVETA, O.V and OSAKWE, S.A. Determination of Heavy Metal Contents in Refined Petroleum Products. **Journal of Applied Chemistry (IOSR-JAC)**. Volume 7, Issue 6 Ver. I. PP 01-02. 2014.

ALMEIDA, E. S.; SILVA, L. A.; SOUSA, R. M.; RICHTER, E. M.; FOSTER, C. W.; BANKS, C. E.; MUNOZ, R. A. Organic-resistant screen-printed graphitic electrodes: Application to on-site monitoring of liquid fuels. **Analytica Chimica Acta**, v.934, p.1-8, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.05.055>.

ANTUNES, G. A.; SANTOS, H. S. dos; SILVA, Y. P. da; SILVA, M. M.; PIATNICKI, C. M. S.; SAMIOS, D. Determination of iron, copper, zinc, aluminum, and chromium in biodiesel by flame atomic absorption spectrometry using a microemulsion preparation method. **Energy Fuels**, v.31, p.2944-2950, 2017. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.6b03360>

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria SVS/MS nº. 685, de 27 de agosto de 1998. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 28 ago. Seção 1. 1998.

ATARO, A., MCCRINDLE, R. I., BOTHA, B. M., MCCRINDLE, C. M. E., & NDIBEWU, P. P. Quantification of trace elements in raw cow's milk by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). **Food Chemistry**, 111(1), 243–248. 2008.

BEACH, J.; TUME, P.; LONGAN, L.; REVERT, F.; BECH, J.; TUME, L.; TEMPIO, M. Concentration of Cd, Cu, Pb, Zn, Al, and Fe in soils of Manresa, NE Spain. **Environmental Monitoring and Assessment**. 14, 257–266. 2008.

BOMJARDIM, H. A.; OLIVEIRA, C.M.C.; SILVEIRA, J.A.S.; SILVA, N.S.; DUARTE, M.D.; FAIAL, K.C.F.; BRITO, M.F. e BARBOSA, J.D. Deficiências minerais em vacas em lactação da bacia leiteira do município de Rondon do Pará, estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 35(5):409-416. 2015. DOI: 10.1590/S0100-736X2015000500004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2015, Julho 20). Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes - PNCRC de 2015 para as cadeias de carnes bovina, suína, caprina, ovina, equina, coelho, aves, avestruz, de leite, pescado, mel e ovos (Instrução Normativa nº 13, de 15 de julho de 2015). **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília.

BRITO, M. A. V. P. and BRITO, J. R. F. Qualidade do Leite. Capítulo 3. In: MADALENA, F. E.; MATOS, L. L.; HOLANDA JR., E.V. **Produção de Leite e Sociedade: Uma análise crítica da cadeia do leite no Brasil**, 2001.

CAGGIANO, R., SABIA, S., D'EMILIO, M., MACCHIATO, M., ANASTASIO, A., RAGOSTA, M.; PAINO S. Metal levels in fodder, milk, dairy products, and tissues sampled in ovine farms of Southern Italy. **Environmental Research**, 99, 48–57. 2005.

CARDOSO, K. M.; PAULA, A. de; SANTOS, J. S. dos; SANTOS, M. L. P. dos. Uso de espécies da arborização urbana no biomonitoramento de poluição ambiental. **Ciência Florestal**, v.27, p.535-547, 2017. <https://doi.org/10.5902/1980509827734>.

CATARINO S., CURVELO-GARCIA A.S., BRUNO de Sousa R. Revisão: Elementos contaminantes nos vinhos. **Ciência e Técnica Vitivinícola**, 22 (2), 45-61. 2007.

CATARINO S., MADEIRA M., MONTEIRO F., ROCHA F., CURVELO-GARCIA A.S., BRUNO DE SOUSA R. Effect of bentonite characteristics on the elemental composition of wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56, 158-165. 2008.

CATARINO S.C.G. Metais contaminantes nos vinhos. Ocorrência por influência das bentonites. Tese de Doutorado em Engenharia Agro-Industrial. Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa. 2006.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA. Resolução no 420, de 28 de dezembro de 2009. "Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de

áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas.", Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília, DF, nº 249, de 30/12/2009. p.81-84.

CUMPRA-SE. **Chumbo na Gasolina**. 2004. Disponível em: [http:// www.minc.com.br/cump-ra-se/leiscump.htm](http://www.minc.com.br/cump-ra-se/leiscump.htm). Acesso em: 28 de mar de 2019.

ENB, A.; ABOU-DONIA, M. A.; ABD-RABOU, N. S.; ABOU-ARAB, A. A. K. and EL-SENAITY, M. H. Chemical composition of raw milk and heavy metals behavior during processing of milk products. **Global Veterinaria** 3(3), 268-275. 2009.

FEDERAÇÃO DAS INDÚSTRIAS DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Outlook Fiesp 2015-2026: projeções para o agronegócio brasileiro**. São Paulo: Fiesp, 90 p. 2016.

FRANÇA, F.C.S.S. ALBUQUERQUE, A.M.A. ALMEIDA, A.C. SILVEIRA, P.B. FILHO, C.A. HAZIN, C.A. and HONORATO, E.V. Heavy metals deposited in the culture of lettuce (*Lactuca sativa* L.) by the influence of vehicular traffic in Pernambuco, Brazil. **Food Chemistry** 215, 171–176. 2017.

GARBA, S.T.; ABDULLAHI, S.; ABDULLAHI, M. Heavy metal content of cow's milk from Maiduguri Metropolis and its environs, Borno State Nigeria. **American Journal of Engineering Research**, v.7, p.63-73, 2018.

GOMES, A.C.S.; LINDINO, C.A.; GONÇALVES JR, A.C.; GOMES, G.D. Determinação de Cd, Cr e Pb no leite e na alimentação bovina do Brasil. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.72, n.3, p.211-218, 2013.

GÓMEZ M.M.C., BRANDT R., JAKUBOWSKI N., ANDERSON J.T. Changes of the metal composition in german white wines through the winemaking process. A study of 63 elements by inductively coupled plasma-mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52, 2953-2961. 2004.

IBGE, 2017. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Pesquisa da Pecuária Municipal. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas->

novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=resultados>. Acesso em 28 jan. 2020.

JOLIFFE, I. T. (1986). *Principal component analysis*. New York: Springer.

KHAN, S.; CAO, Q.; ZHENG, Y.M.; HUANG, Y.Z.; ZHU, Y.G. Health risks of heavy metals in contaminated soils and food crops irrigated with wastewater in Beijing, China. **Environmental Pollution.**, 152 (2008), pp. 686-692.

KHEIR, R.B.; SHOMAR, B.; GREVE, M.B.; GREVE, M.H. On the quantitative relationships between environmental parameters and heavy metals pollution in Mediterranean soils using GIS regression-trees: The case study of Lebanon. **Journal of Geochemical Exploration.** 147, 250–259. 2014.

KIRA, C. S., and MAIO, F. D. Comparison of partial digestion procedures for determination of Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, and Zn in milk by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Journal of AOAC International**, 87(1), 151–156. 2004.

LEONIDIS, A.; CRIVINEANU, V.; GORAN, G.V.; CODREANU, M.D. The level heavy metals in blood and milk from cattle farmed near polluting industries in the Province of Thessalonic. **Lucrări Stiintifice Medicină Veterinară**, v.43, p.153-158, 2010.

LÓPEZ-ALONSO, M. L., BENEDITO, J. L., MIRANDA, M., CASTILLO, C., HERNANDEZ, J., & SHORE, R. F. Interactions between toxic and essential trace metals in cattle from a region with low levels of pollution. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 42(2), 165-172. 2002.

LÓPEZ-ALONSO, M. L., MONTAÑA, F. P., MIRANDA, M., CASTILLO, C., HERNÁNDEZ, J., & BENEDITO, J. L. Interactions between toxic (As, Cd, Hg and Pb) and nutritional essential (Ca, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Se, Zn) elements in the tissues of cattle from NW Spain. **Biometals**, 17(4), 389-397. 2004.

MAHAJAN, V.E.; YADAV, R.R.; DAKSHINKAR, N.P.; DHOOT, V.M.; BHOJANE, G.R.; NAIK, M.K.; SHRIVASTAVA, P.; NAOGHARE, P.K.; KRISHNAMURTHI, K. Influence of mercury from fly ash on cattle reared nearby thermal power plant. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.184, p.7365–7372, 2012.

MARCOLINO, G.V. **Detecção de metais pesados em leite integral cru de vacas criadas no Agreste Meridional do estado de Pernambuco**. Garanhuns, 2014. 48p. Dissertação (Mestrado em Sanidade e Reprodução de Ruminantes da Universidade Federal Rural de Pernambuco).

MASSART, D.L., KAUFFMAN, L. Hierarchical clustering methods. In: **The interpretation of analytical chemical data by the use of cluster analysis**. New York: John Wiley & Sons, pp. 75-99. 1983

MASSART, D.L., VANDEGINSTE, B.G.M., DEMING, S.N., MICHOTTE, Y., & KAUFMAN, L. **Chemometrics: A textbook**. Vol. II, Amsterdam: Elsevier, pp. 26. 1988.

NICOLINI G., LARCHER R., PANGRAZZI P., BONTEMPO L. Changes in the contents of micro- and trace- elements in wine due to winemaking treatments. **Vitis**, 43 (1), 41-45. 2004.

NOROUZIRAD, R.; GONZÁLEZ-MONTAÑA, J.R.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; HOSSEINI, A.S.; KHABAZKHOOB, M.; MALAYERI, F.A.; BANDANI, H.M.; PAKNEJAD, M.; FOROUGHI-NIA, B.; MOGHADDAM, A.F. Lead and cadmium levels in raw bovine milk and dietary risk assessment in areas near petroleum extraction industries. **Science of the Total Environment**, v.365, p.308-314, 2018.

OKADA IA, SAKUMA AM, MAIO, FD, 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**. 31(2):140-3. 1997.

PATRA, RC, SWARUP, D, KUMAR, P, NANDI, D, NARESH, R, Ali, SL. Milk trace elements in lactating cows environmentally exposed to higher level of lead and cadmium around different industrial units. **Science of the Total Environment**. 404:36-43. 2008.

PENG, C.; WANG, M.; CHEN, W.; CHANG, A.; CRITTENDEN, C.J. Mass balance-based regression modeling of Cd and Zn accumulation in urban soils of Beijing. **Journal of Environmental Sciences**. 53, 99–106. 2017.

PILARCZYK, R.; WÓJCIK, J.; CZERNIAK, P.; SABLİK, P.; PILARCZYK, B.; TOMZAMARCINIAK, A. Concentrations of toxic heavy metals and trace elements in raw milk of Simmental and Holstein-Friesian cows from organic farm. **Environmental Monitoring Assessment**, v.185, p.8383-8392, 2013.

QIN, L.Q.; WANG, X.P.; LI, W.; TONG, X.; TONG, W.J. The minerals and heavy metals in cow's milk from China and Japan. **Journal of Health Science**, v.55, n.2, p.300-305, 2009.

SIKIRIC, M.; BRAJENOVIC, N.; PAVLOVIC, I.; HAVRANEK, J. L. and PLAVLJANIC, N. Determination of metals in cow's milk by flame atomic absorption spectrophotometry. **Czech Journal of Animal Science** 48(11), 481-486. 2003

SOUZA, M.V.; VIANNA, M.W.S.; ZANDIM, B.M.; FERNANDES, R.B.A.; FONTES, M.P.F. Metais pesados em amostras biológicas de bovinos. **Ciência Rural**, v.39, n.6, p.1774–1781, 2009.

SUTTLE, N. F. The interactions between copper, molybdenum, and sulphur in ruminant nutrition. **Annual Reviews Nutrition**. 11 :121-40. 1991.

SWARUP, D.; PATRA, R.C. Blood lead levels in lactating cows reared around polluted localities; transfer of lead into milk. **Science of the Total Environment**, v.347, p.106–110, 2005.

TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J. e PEIXOTO, P.V. Deficiências minerais em animais de fazenda, principalmente bovinos em regime de campo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 20(3):127-138. 2000.

VITTORI ANTISARI, L.; ORSINI, F.; MARCHETTI, L.; VIANELLO, G. GIANQUINTO G. Heavy metal accumulation in vegetables grown in urban gardens. **Agronomy for Sustainable Development.**, 35 pp. 1139-1147. 2015.

Table 1. Toxic and essential trace element concentration (in mg/L) in milk in our study.

	Mean±SE	Median	GM	Range	25P	75P
Pb	0,0431±0,0015	0,0400	0,03962	0,0130-0,0980	0,0283	0,0528
Cd	0,0069±0,0003	0,0060	0,0060	0,0020-0,0160	0,0040	0,0092
Cu	0,0195±0,0008	0,0170	0,0171	0,0050-0,0720	0,0140	0,0220
Zn	0,6212±0,0223	0,5900	0,55849	0,0333-1,9100	0,4508	0,7510
Fe	0,0545±0,0036	0,0410	0,04041	0,0021-0,2830	0,0255	0,0730

Table 2. Summary of the general lineal model to evaluate the effect of type of milking (M), proximity of main roads (R) and effluents (E) and their interactions on the toxic and essential trace element concentration in milk in this study (* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001).

Element	M	R	E	M*R	M*E	R*E	M*R*E
Cd	–	**	–	–	–	–	–
Pb	*	**	–	–	–	–	–
Cu	–	*	*	–	–	–	–
Fe	–	–	–	–	–	–	–
Zn	–	–	–	–	–	–	–

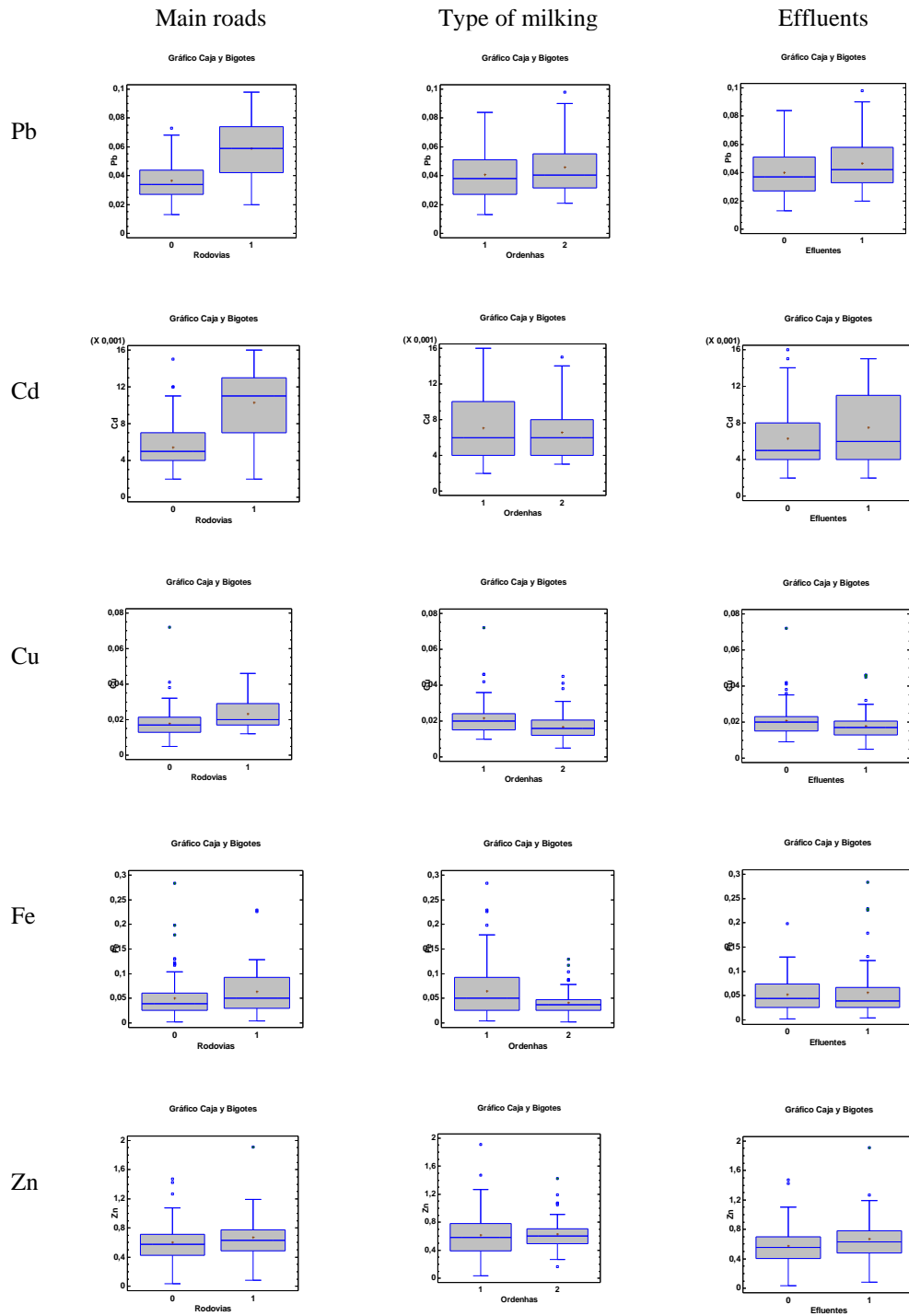
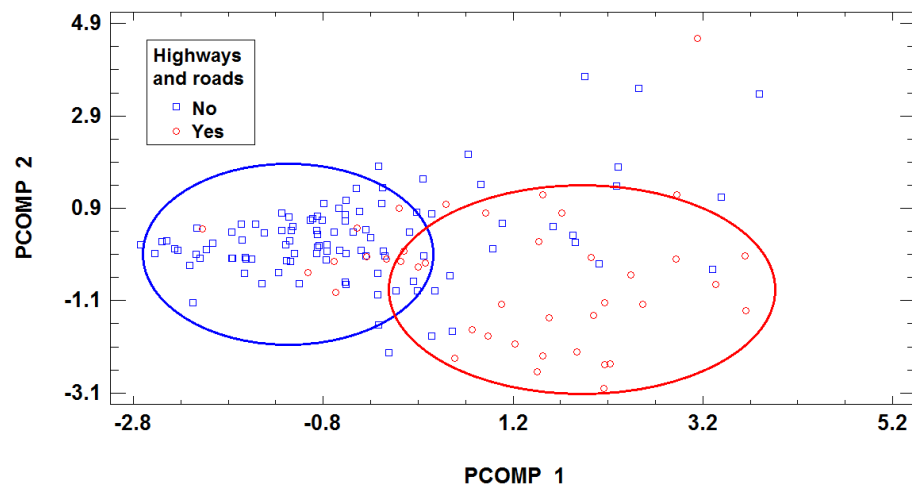


Figure 1. Box and whiskers showing the effect of proximity to main roads, effluents and type of milking on toxic and trace element concentrations in milk

Table 3. Eigenvalues and variance explained for the principal components obtained from PCA.

PC	Eigenvalue	% variance explained	%Cummulative variance explained
1	2.416	48.33	48.33
2	1.352	27.05	75.38
3	0.778	15.56	90.94
4	0.392	7.84	98.78
5	0.060	1.22	100.00

(a)



(b)

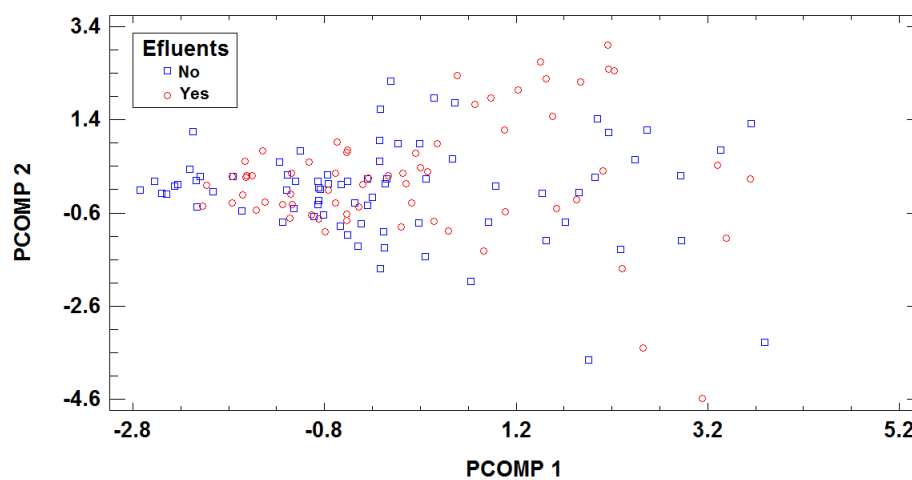


Figure 2. 2D-score plot of the samples obtained from PCA according to the proximity of highways and main roads to the livestock exploitations (a), and according to the milking system (b).

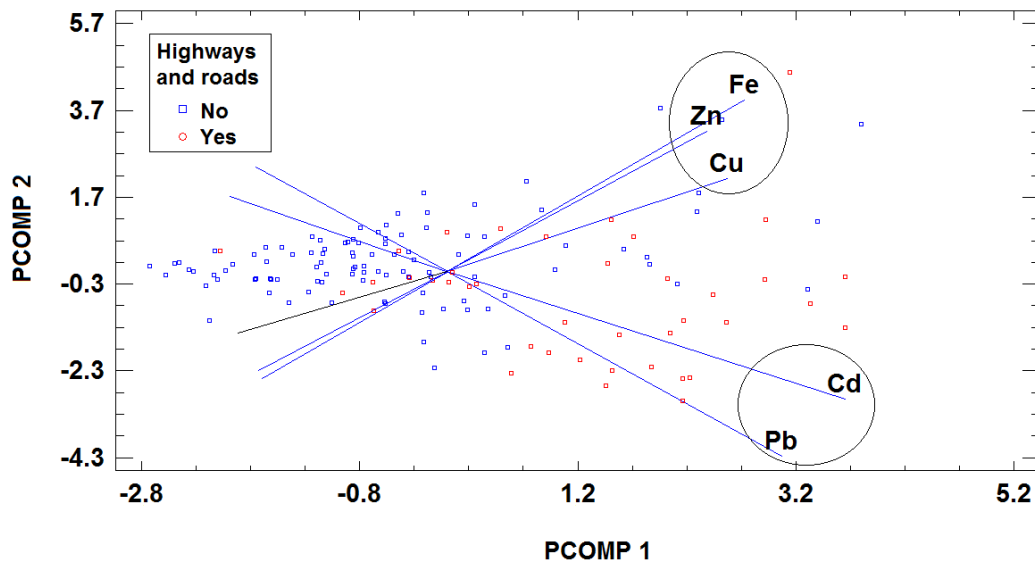


Figure 3. Biplot of the whole data set obtained from PCA. Samples are coded according to the proximity to main roads.

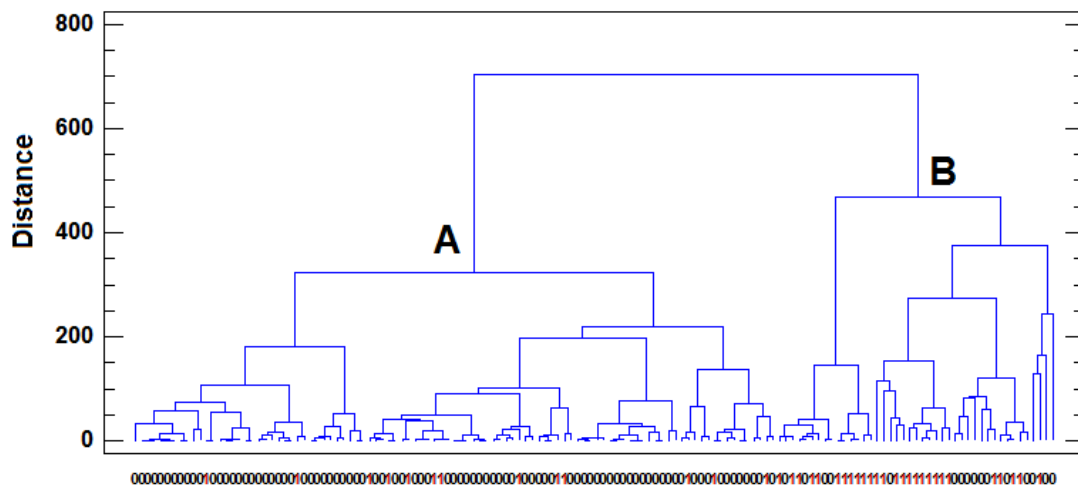


Figure 4. Dendrogram of the samples according to their vicinity to main roads obtained from HCA (Squared Euclidean distance and Ward agglomerative method).

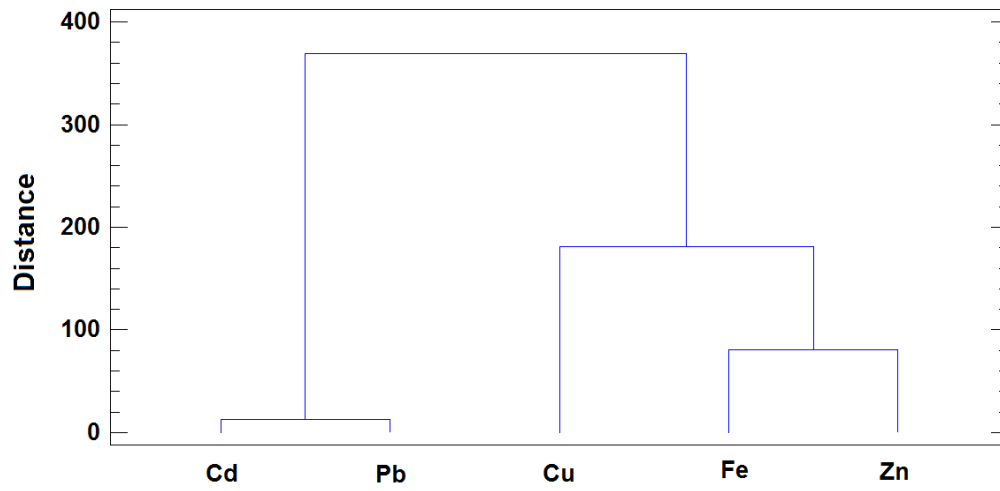


Figure 5. Dendrogram of the variables obtained from HCA (Squared Euclidean distance and Ward agglomerative method).

5.2. Concentrations of essential and toxic metals in Galician cheese

Abstract

Galicia is a region located to the northwest of Spain, has a great tradition in the production of milk and in the manufacture of cheese, several of which have recognized Protected Designations of Origin (PDOs). The objective was to evaluate the concentrations of essential and toxic metals in artisanal cheeses produced and marketed in the Galicia-Spain region. 58 samples of cheese were collected classified according to their production and characteristics in industrial, artisanal and organic. The samples were obtained in three cities in the region: Santiago de Compostela, Lugo and Coruña. 14 mineral elements (As, Cd, Co, Cr, Cu, I, Fe, Pb, Mn, Hg, Mo, Ni, Se and Zn) were analysed, determined in triplicate by ICP-MS. Statistically significant differences were found in Galician cheeses for most of the main toxic and essential elements, depending on the type of manufacturing process. Industrial cheeses showed significantly higher levels ($p < 0.05$) of Cu, Se and Zn. Artisanal cheeses showed significantly higher concentrations of toxic elements such as Cd and Pb compared to industrial and organic cheeses, also showed significantly higher concentrations of Fe and Mo. In summary, industrial cheeses are clearly different from the essential and toxic metals present when compared to artisanal and organic cheeses. In addition, artisanal and organic cheeses are similar in their metallic concentrations.

Index terms: Cheese, contamination, galicia, heavy metals, Spain.

Resumo

A Galícia é uma região localizada a noroeste da Espanha, possui uma grande tradição na produção de leite e na fabricação de queijos, vários destes possuem Denominações de Origem Protegidas (DOP) reconhecidas. Objetivou-se avaliar as concentrações de metais essenciais e tóxicos em queijos artesanais produzidos e comercializados na região da Galícia-Espanha. Foram coletadas 58 amostras de queijos classificados de acordo com sua produção e características em industrial, artesanais e orgânicos. As amostras foram obtidas em três cidades da região: Santiago de Compostela, Lugo e Coruña. Foram analisados 14 elementos minerais (As, Cd, Co, Cr, Cu, I, Fe, Pb, Mn, Hg, Mo, Ni, Se e Zn), determinadas em triplicado por ICP-MS. Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nos queijos galegos para a maioria dos principais elementos tóxicos e essenciais, dependendo do tipo de processo de fabricação. Os queijos industriais apresentaram níveis significativamente mais altos ($p < 0,05$) de Cu, Se e Zn. Já os queijos artesanais Evidenciaram concentrações significativamente mais altas de elementos tóxicos como Cd e Pb em comparação com os queijos industriais e orgânicos, também apresentaram concentrações significativamente maiores de Fe e Mo. Em resumo, os queijos industriais são claramente diferentes em relação aos metais essenciais e tóxicos presente se comparados aos queijos artesanais e orgânicos. Além disso, os queijos artesanais e orgânicos são semelhantes nas suas concentrações metálicas.

Palavras-chave: Queijo, contaminação, Espanha, galícia, metais pesados.

Introduction

Cheese has a long history in the human diet. In ancient times, cheese was primarily a concentrated form of milk with the benefit of a prolonged shelf life, its high content of fat and protein making it an essential energy-rich and nutritious food for our ancestors. Today the main reasons for the cheese consumption have changed and they are related to its manifold uses in the kitchen and its enjoyment. In fact, the technological progress has led to a multitude of different types of cheese on the market, varying in raw material, texture, flavor and other organoleptic properties.

Moreover, recent advances in nutrition science also have highlighted the contribution of cheese to nutrition and health: cheese is a rich source of essential nutrients, in particular, proteins, bioactive peptides, amino acids, fat, fatty acids, vitamins and minerals. The high concentration of calcium in cheese is well known to contribute to the formation and maintenance of strong bones and teeth, but also shows positive effects on blood pressure and helps in losing weight in combination with low-energy diets (WALTHER et al., 2008). In addition, conjugated linoleic acid and sphingolipids present in cheese can exert anti-carcinogenic activity (WALTHER, SCHMID, SIEBER, & WEHRMÜLLER, 2008).

The nutritional and organoleptic properties of cheese are highly dependent on the raw materials (mainly the milk composition) but also on the manufacturing process. It is well documented that the fatty acid profile of cheese is closely related to the dairy feed (with a great influence of grazing; COPPA et al., 2011) and also several sensorial properties are clearly linked to the manufacturing process (raw vs. pasteurized milk; Fernández-García et al., 2002).

However, as far we are concerned, information on the influence on the type of milk and the manufacturing process on the trace element concentrations and toxic element residues in cheese is very limited. Recent studies pointed out important differences in the mineral profile of the raw milk depending on the dairy management. For example, it is well described that organic milk shows lower iodine concentrations than conventional milk due to lack of routinely mineral feed supplementation and the less frequent practice of teat dipping with iodine-disinfectants (REY CRESPO et al., 2013; FLACHOWSKY et al., 2014).

It is also likely that differences in the manufacturing process between industrial and artisanal cheese may also influence their metal profile. In example, the direct and prolonged

contact of acidic food with stainless steel equipment during manufacturing processes can leach in a significant concentration of Ni and Cr in the product (KAMERUD et al., 2016).

Galicia is a region in NW Spain with a large tradition in cheese-making leading the manufacture of cow milk cheeses in Spain, 38% (more than 2000 million litres in 2017) of the total Spanish cow-milk production being generated in this region (MAPA, 2017). Thus, Galician cheeses represent one quarter (more than 5.4 million kg) of the total annual production of cows' milk cheeses manufactured in Spain. Even though there are several recognized Protected Denomination of Origin (PDO), all Galician cheeses are soft or semi-soft cheeses obtained mainly from rennet curd with a short ripening time (7–60 days), giving them quite similar organoleptic characteristics regarding flavour and texture.

Although in the past decades Galician cheeses were generally elaborated in an artisan way in the own dairy with raw milk from pastured cattle, (RODRIGUEZ-ALONSO et al., 2009) nowadays most of them follow an industrial manufacturing process using milk from intensive production systems. In spite of this fact, a significant market of handmade artisan cheeses (directly produced in the farm at a familiar scale and very appreciated by the consumers) still remains, being commercialized in local markets and delicatessen stores.

Parallel, in the past few years, the production of Galician artisan organic cheese has grown continuously, maintaining the tradition but incorporating organic rules (remarkably prohibiting or minimizing the use of chemical such as fertilizers or mineral supplements). These artisan and organic cheeses are produced with raw milk from pastured-cows, what gives them particular organoleptic characteristics as well as a heart-healthy fat profile.

Although not studied up to date, artisan cheeses from pastured milk could have characteristic mineral profiles when comparing to industrial ones made under industrialized manufacturing process using milk from more technological farms where cows received intensive diets with mineral supplements.

The objective of this paper is to evaluate the trace element composition and the toxic element residues of Galician cow cheese according to their production system/manufacturing process (artisan, industrial and organic).

Material and methods

Sample collection

Fifty-eight representative samples of Galician cheeses we used for this study. European Union applies schemes of geographical indications and traditional specialties (such as Protected Denomination of Origin) in order to promote and protect the quality of certain agricultural products and foodstuffs. In the case at hand, all samples were cheeses with quality label belonging to one of the following PDOs: Arzua-Ulloa, Tetilla and San Simon from Costa. Representative samples of industrial (n=30), and organic (n=10) Galician cow cheeses were obtained from local supermarkets and delicatessen stores, while artisan (n=18) samples were directly purchased from producers during January-February 2019 (figure 01)

All samples were made from pressed white curd, except 10 industrial samples representing PDO San Simon da Costa, which are samples suffering a smoking process after elaboration (GONZÁLEZ-GARCÍA et al., HOSPIDO, MOREIRA, FEIJOO, & ARROJA, 2013). Collected samples were packed in polyethylene closed bags, transported to the laboratory and preserved under appropriate conditions until analysis.

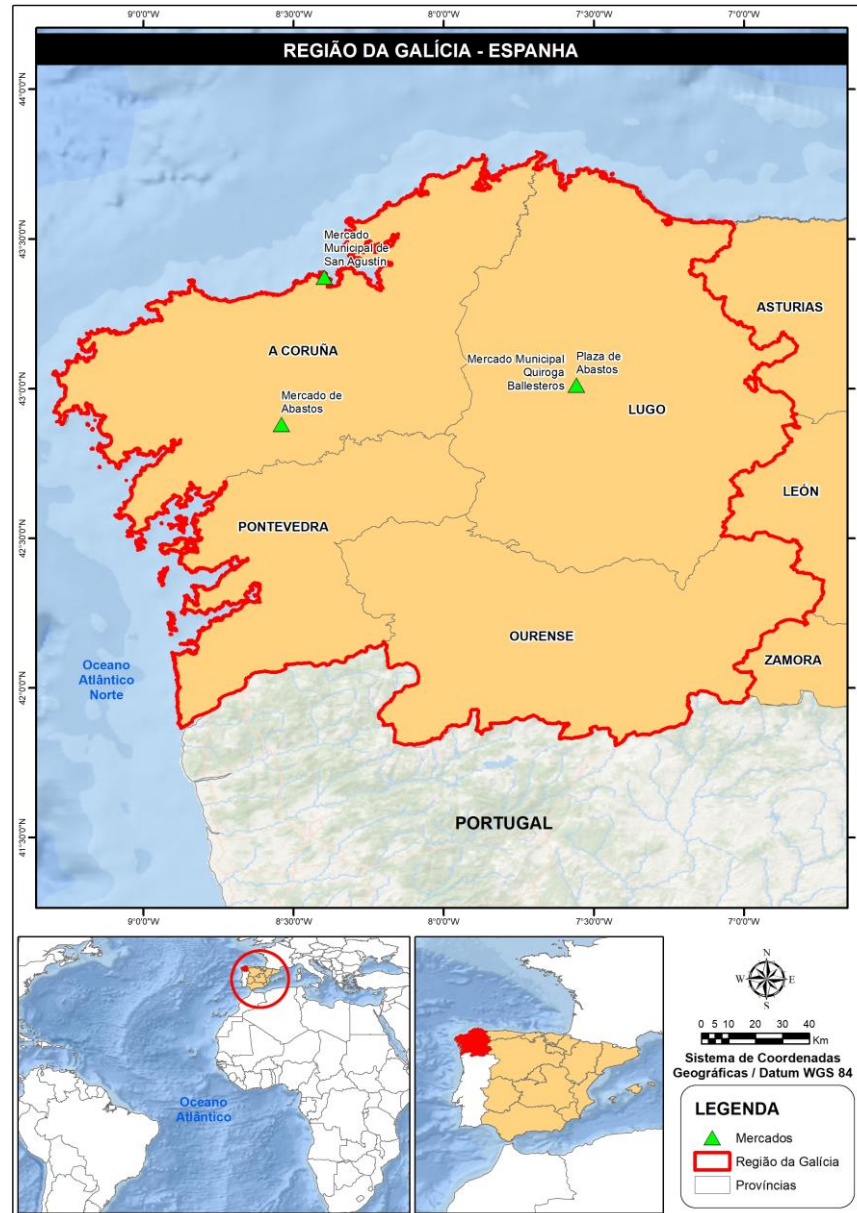


Figure 01. Map of Galicia and sample collection points.

Sample preparation

Before digestion of the cheeses, the samples were weighed and processed to obtain and calculate the dry extract (%). The cheese samples were removed from the refrigerator, cut into small fragments, weighed on an analytical balance (precision of 0.1 mg minimum) and homogenized with washed and fine sea sand in separate metal capsules for drying with a stick of glass. Each metallic capsule added with sand was dried in a dehydrator equipped with silica gel at $102 \pm 2^\circ\text{C}$ for 30 minutes. Subsequently, the capsules were removed and left until they cool to room temperature (r.t.) and were weighed to obtain Weight 1 (P1). After this procedure, 2g of sample were weighed in each capsule, homogenizing the entire sample with

sand and stick, being introduced into the oven keeping them for 24 hours at a temperature of $102 \pm 2^\circ\text{C}$. Finally, after this period and cooling of each capsule, the samples were weighed to obtain Weight 3 (P3). The formula: $\text{E.S.T.\%} = 100 \cdot (\text{P3} - \text{P1}) / \text{g of sample}$ was used as the basis for obtaining the samples' dry extract. The procedure was performed with at least) ISO 5534|IDF 4:2004 specifies the reference method for the determination of the total solids content of cheese and processed cheese.

Digestion sample

Cheese samples were fragmented and then weighed between 1 and 1.5 g. The samples were then acid digested before ICP-MS analysis was digested in 3 mL of 69% concentrated nitric acid, 2 mL of 33% w/v hydrogen peroxide and 5 ml of ultrapure water in a microwave-assisted digestion system (Ethos Plus, Milestone, Sorisole, Italy).

The microwave oven temperature program consisted of two steps: (i) increase from room temperature to 200°C , ramp time 10 min, (ii) 200°C for 10 min and (iii) cool down for 5 min. Once cooled, the digested samples were transferred to polypropylene sample tubes and diluted with Milli-Q ultrapure water up to the final volume of 25 ml. Samples were prepared for iodine determination by a high temperature alkaline extraction procedure (EN., 2007).

Sample analysis

Essential trace and toxic element concentrations were determined by ICP-MS (VG Elemental Plasma Quad S-Option equipped with a Micromist low-flow nebulizer for a Peltier device, quartz double pass spray chamber and a quartz torch: Thermo Fischer Scientific). All solutions were prepared from ultrapure water of resistance $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ produced with a Milli-Q purification system (Millipore Corp., Bedford, MA).

Stock ultrapure grade standard solutions (1000 mg/L) of the elements determined were purchased from Merck (Poole, U.K.): ICP Multi element standard solution IV certiPUR® in the case of Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni and Zn; and ICP standard certiPUR® for Se; stock standard solutions for As and Mo were obtained respectively from SCP Science (Montreal, Canada) and from Panreac (Barcelona, Spain). A stock solution of tetramethylammonium hydroxide (TMAH) (Panreac) was prepared in water (25% w/v) for use in the alkaline extraction. A standard stock solution of iodide (1000 mg L^{-1}) was prepared from potassium

iodide (Panreac). Ultrapure nitric acid (69%) was obtained from Merck and hydrogen peroxide (33% w/v) from Panreac.

The concentrations of 14 mineral elements (As, Cd, Co, Cr, Cu, I, Fe, Pb, Mn, Hg, Mo, Ni, Se and Zn) were determined in triplicate in all milk samples in Scientific-Technological Support Center (CACTUS) of the University of Santiago de Compostela, in the building of the Research and Technological Development Support Infrastructure Network (RIAIDT). The experimental conditions for the ICP-MS method used are described in detail in a previously published paper (Rey-Crespo et al., 2013).

An analytical quality control programme was applied throughout the study (Table 1). Blank samples were processed with test samples, and the values used in further data processing were calculated by subtracting the blank from the sample readings. Detection limits were calculated as three times the standard deviation of the reagent blanks. Quantification limits were calculated on the basis of the sample weight and the dilution. All samples showed mineral concentrations above the limits of quantification except for Hg for which none sample showed appreciable residues. Analytical recovery, determined from the certified reference material (CRM) NISTSRM-1549 analysed together with the samples, show acceptable agreement between the measured and certified values.

Statistical analysis

According to the results of the trace element determinations, an $X_{58 \times 13}$ matrix was constructed for data analysis, where the rows correspond to the 58 studied cheese samples and the columns to the contents of the 13 metal and trace elements determined by ICP-MS. Statistical procedures applied for studying the data matrix were the following. Data normality was checked using the Kolmogorov–Smirnov test. The data were not normally distributed and therefore they were log-transformed before analysis. The potential influence of smoking procedure on the trace and toxic element concentrations for the industrial cheese from San Simon da Costa against the other industrial samples from other origins was evaluated by Student T-test. Differences in toxic and trace elements concentrations in industrial, artisan and organic cheese were evaluated by one-way Anova and post-hoc Tuckey tests. All the statistical analyses were performed using IBM SPSS for Windows v.21 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA).

Results and discussion

As it was described in the *Data collection* section, in a particular region of Galicia, cheese undergoes a smoking process. Therefore, two different types of industrial Galician cheeses can be found in the market: samples made from pressed white curd, and cheeses with a smoked rind after a final smoking process in its elaboration. Therefore, the first step in data analysis was to evaluate if the smoking process could influence the metal content of the samples. Table 2. compares concentrations of toxic and essential trace element in industrial cheese depending on the presence or not of a smoking process (Student T-tests were developed in order to compare the mean metal concentrations in both subgroups).

No statistically significant differences were found for any element between smoked and no-smoked cheeses. This means that: (i) the potential increase of metallic content of the product due to the smoking stays in the non-edible crust of the cheese and does not move to its eatable inside-part, and (ii) the absence of significant differences in metal content implies that both cheese subtypes belongs to industrial group and they were subsequently analyzed as a single group. Therefore, for subsequent statistical and chemometric analysis, the three established groups, industrial, artisan and organic, were considered as described above.

The results of a univariate study on the essential and toxic trace element concentrations in Galician cheese are presented in Figure 1 as whisker-plots according to their manufacturing process. Overall, toxic element residues are low and similar to those described for LLOBET et al. (2003), when carrying out a study to estimate the food intake of heavy metals by the population (children, adolescents, male and female adults and the elderly) from Catalonia, Spain, they showed a low intake of the elements from the cheeses consumed, and the population was not considered a risk. Corresponding to geographical areas of low level of environmental exposure. Essential trace elements are also within the normal range in cheeses. Also, according to the authors, inorganic or aggregated forms of chemical substances such as metalloids, heavy metals, etc. represent a serious risk in food and food as they develop long-term toxicological effects.

The concentrations of metals in milk and dairy products can vary due to several factors, such as the work environment, production technology, type of material used in the processing, among other factors subject to contamination during the various stages of the manufacturing processes.

Yüzbaşı et al., (2010) when evaluating 240 samples of cheese in Turkey, found higher amounts of Pb in some moments of collection and in different cheese productions. Differences were found in the levels of Cd and Fe at different times of the year. Fact that the authors attributed to some contamination process during milk production and / or cheese making, depending on the equipment used.

Statistically significant differences were found in Galician cheeses for most of the main toxic and essential elements depending on the type of manufacturing process (Figure 1). Overall, two main patterns could be described. On one side, the industrial cheese showed significantly higher levels ($p < 0.05$) of the essential trace elements that are routinely supplemented in intensive dairy farming: Cu, Se and Zn (LÓPEZ-ALONSO, 2012). In spite of industrial cheeses do not showed statistically significant differences in Cr levels in relation to artisan and organic samples, a clear tent to slightly high Cr concentration has been detected in industrial products.

Kodrik et al. (2011), when assessing the levels of As, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, V, Ni, Pb and Zn in cow's milk and cheese, observed higher concentrations of Cr, Cu, Fe, V, Mn, Cd, As and Pb in milk in high traffic areas than in milk from unpolluted green areas. However, in cheese only the concentrations of Cu, Cr, Fe and Pb were significantly higher in road samples than in unpolluted green samples.

This fact could be explained due to the contact of the milk/cheese dough with stainless steel equipment (with Cr content up to 20%) during the industrial manufacturing process (KAMERUD et al., 2016). On the other hand, the artisan cheeses showed significantly higher concentrations of toxic elements such as Cd and Pb compared to the industrial and organic cheeses. Moreover, the artisan cheeses showed also significantly higher Fe and Mo concentrations. This fact is possibly related to the soil ingestion by cows when grazing.

Ingestion of soil constitutes an important route of cattle exposure for contaminants not geochemically or biologically mobile (SHEPPARD, EVENDEN, & SCHWARTZ, 1995), and in fact, in organic and non-intensive grazing cattle, ingestion of soil during grazing largely influences the trace element status of the milk (RODRÍGUEZ-BERMUDEZ et al., 2018). The fact that organic cheeses showed a different pattern than the artisan ones even though the livestock production system (based on pasture) is similar can be related to a reduced toxic metal exposure in this production system. It is well demonstrated that the use of chemicals represents the main exposure source to toxic elements for the animal, and in organic farming they were very limited (EU, 2008). For example, it is well documented that traces of cadmium

in the phosphate fertilizers represent one of the main sources of cadmium exposure in conventional agriculture (GRANT, 2015).

In Galicia, artisan cheeses are produced, in general, in little family-managed farms from using milk obtained from a livestock production system based on pasture. This means that artisan productions are very similar to organic ones because in these small exploitations the use mineral supplemented feed and other chemicals is very limited (due to economic reasons) and the production procedures are comparable to those employed by organic-certified producers.

On the other hand, iodine-based disinfectants are non-rinsing detergents and antiseptics commonly employed in food contact surfaces for eliminating microorganisms and bacteria producing bad conditions and economic losses to livestock and food industries. Washing and dipping the teats before milking affected iodine in milk, and therefore in cheese (BORUCKI CASTRO et al., 2010). The presence of Cd and Cr it is associated to the use of stainless-steel equipment in the industrial fabrication of cheese (STOEWSAND et al., 1979).

This is because trace element concentrations in soil are much higher (up to 4 orders of magnitude) than in vegetables (LÓPEZ-ALONSO, REY-CRESPO, HERRERO-LATORRE, & MIRANDA, 2017). Inclusion of results of Zn and Mo contributes to this same explication. Next, that included several elements that are presumably related with feed (I, Se, Cu, and Mn). In spite of in the artisan-organic group cheese is elaborated from milk produced from pasture, in which mineral supplementation is not routinely used, the occasional use of mineral supplemented concentrate feed as complementary feed during the winter in the small familiar dairy farms that produced artisan cheese could explain our results.

In this case, Se and I are within the “feed” group since both elements are included in the mineral premixtures but, unlikely in intensive dairy farming, not used in sanitary-management practices. Finally, has been identified including elements typically related to the soil (Co, As and Ni). We are not aware why these elements appear separately from Fe or Cr, minerals that are clearly related to the soil, and with which they are closely related in previous studies of our group in organic farming (LÓPEZ-ALONSO et al., 2017; RODRIGUEZ-BERMÚDEZ et al., 2018). It is possible that some difference in the grazing management between the organic and small conventional grazing farms producing artisan cheese could lead to this separation.

Conclusions

This is the first work carried out in Spain that reveals the concentration of essential and toxic metals in artisanal cheese from Galicia. As a result of the study, we see that industrial cheeses produced in Galicia from milk from intensive farms are clearly different, in terms of metallic content, from artisanal and organic cheeses. In addition, artisanal and organic cheeses are similar in terms of metallic profile, that is, artisanal cheeses are comparable to those produced with an eco-label, in relation to their metallic composition. The relationships between different metals for the industrial group can be explained in terms of the influence of the type of milk production, the technological process of cheese production, the cattle and soil diet. It is not so in the case of artisans and organics, where the identification of relationships between variables is limited to the influence of the soil and to a lesser extent of the diet.

About smoked and non-smoked industrial cheeses, the concentrations observed in the present study do not show significant differences in the content of metals. Evidencing that the industrial and technological process employed in smoking does not interfere with metal concentrations.

Considering the information presented in the present study, the concentrations of essential and toxic metals are not considered as risk factors for public health, since their concentrations are below the limits established by health legislation.

REFERENCES

BORUCKI CASTRO. S.I., BERTHIAUME. R., LAFFEY. P., FOUQUET. A., BERARDIN. F., ROBICHAUD. A., & LACASSE. P. Iodine Concentration in Milk Sampled from Canadian Farms. **Journal of Food Protection.** 73, 1658-1663. 2010. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-73.9.1658>.

COPPA, M., FERLAY, A., MONSALLIER, F., VERDIER-METZ, I., PRADEL, P., DIDIENNE, R., ... & MARTIN, B. Milk fatty acid composition and cheese texture and appearance from cows fed hay or different grazing systems on upland pastures. **Journal of dairy science**, 94(3), 1132-1145. 2011.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, E., CARBONELL, M., & NUÑEZ, M. (2002). Volatile fraction and sensory characteristics of Manchego cheese. 1. Comparison of raw and pasteurized milk cheese. **Journal of Dairy Research**, 69(4), 579-593.

GONZÁLEZ-GARCÍA, S., HOSPIDO, A., MOREIRA, M.T., FEIJOO, G., & ARROJA, L. Environmental Life Cycle Assessment of a Galician cheese: San Simon da Costa. **Journal of Cleaner Production**. 52, 253-262. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.03.006>.

GRANT, C. A. Influence of phosphate fertilizer on cadmium in agricultural soils and crops. In **Phosphate in Soils**. (pp. 138-163). CRC Press. 2015.

HERLIN, A.H., ANDERSSON, I. Soil ingestion in farm animals. Swedish University of Agricultural Sciences. Report 105. 1996. Available at. <http://www.nks.org/download/pdf/NKSPub/SLU-105.PDF>.

JOLIFFE, I.T. **Principal component analysis**. New York: Springer. 1986.

KODRIK, L.; WAGNER, L.; IMRE, K.; POLYAK, K.F; BESENYEI, F. AND HUSVETH. F. The Effect of Highway Traffic on Heavy Metal Content of Cow Milk and Cheese. **Hungarian Journal of Industrial Chemistry**. Vol 39, No 1. 2011.

LLOBET, J. M.; FALCÓ, G.; CASAS, C.; TEIXIDÓ, A. e DOMINGO, J. L. Concentrations of Arsenic, Cadmium, Mercury, and Lead in Common Foods and Estimated Daily Intake by Children, Adolescents, Adults, and Seniors of Catalonia, Spain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 51, 3, 838-842. 2003.

LÓPEZ-ALONSO, M. **Trace minerals and livestock: not too much not too little**. 2012. ISRN veterinary science, 2012.

LÓPEZ-ALONSO, M., REY-CRESPO, F., HERRERO-LATORRE, C., MIRANDA, M. Identifying sources of metal exposure in organic and conventional dairy farming. **Chemosphere**. 185, 1048-1055. 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.112>.

MAPA, 2018. Declaraciones obligatorias del sector vacuno de leche. https://www.fega.es/sites/default/files/Fega_Declarac_Lacteo_Vacuno_2018_12.pdf?token=j1-elSTr

MASSART, D.L., & KAUFMAN, L. Hierarchical cluster analysis. The interpretation of analytical chemical data by the use of cluster analysis (pp. 75–101). New York, USA: Wiley. 1983.

MASSART, D.L., VANDEGINSTE, B.G.M., DEMING, S. N., MICHOTTE, Y., & KAUFMAN, L. **Chemometrics: A textbook**. Vol. II. Amsterdam: Elsevier pp. 26. 1988.

MEHDI, Y., & DUFRASNE, I. Selenium in Cattle: A Review. **Molecules**. 21, 545-558. 2016. <https://doi:10.3390/molecules21040545>.

PEÑA, D., & SANCHEZ, I. Measuring the advantages of multivariate vs.univariate forecasts. **Journal of Time Series Analysis**. 28, 886-909. 2007. <https://doi:10.1111/j.1467-9892.2007.00538.x>.

SHEPPARD, S.C., EVENDEN, W.G., & SCHWARTZ, W.J. Ingested soil: Bioavailability of sorbed Lead, Cadmium, Cesium, Iodine, and Mercury. **Journal of Environmental Quality**. 24, 498-505. 1995. <https://doi:10.2134/jeq1995.00472425002400030017x>.

STOEWSAND, G.S., STARRIER, J.R., KOSIKOWSKI, F.V., MORSE, R.A., BACHE, C.A., LISK, D.J. Chromium and nickel in acidic foods and by-products contacting stainless steel during processing. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. 21, 600-603. 1979. <https://doi.org/10.1007/BF01685476>.

VENTA QUEIXOS GALEGOS. <http://www.campogalego.com/es/agroalimentacion-es/las-ventas-de-los-quesos-gallegos-con-superaron-los-346-millones-de-euros-en-2017/>

WALTHER, B., SCHMID, A., SIEBER, R., & WEHRMÜLLER, K. Cheese in nutrition and health. **Dairy Science and Technology**. 88, 389-405. 2008. <https://doi.org/10.1051/dst:2008012>.

Table 1. Results of the analytical quality control programme used in the determination of essential trace and toxic elements.

Element	Detection limit ($\mu\text{g/L}$)	NIST-1549		
		Certified levels (mean \pm SD; mg/kg)	Analysed levels (mean \pm SD; mg/kg)	% recovery
Co	0.004	(0.0041)*	0.0041 \pm 0.0009	98.4
Cr	0.009	0.0026 \pm 0.0007	0.0025 \pm 0.0002	94.6
Cu	0.006	0.700 \pm 0.100	0.661 \pm 0.028	94.4
Fe	0.132	1.78 \pm 0.10	1.93 \pm 0.46	110.9
I	0.251	3.38 \pm 0.02	3.56 \pm 0.32	105.0
Mn	0.023	0.26 \pm 0.06	0.24 \pm 0.03	91.4
Mo	0.006	(0.34)	0.325 \pm 0.011	95.8
Ni	0.018	-	-	
Se	0.217	0.11 \pm 0.01	0.12 \pm 0.01	108.1
Zn	0.038	46.1 \pm 2.2	44.3 \pm 2.4	96.2
As	0.020	(0.0019)	0.0019 \pm 0.0004	102.1
Cd	0.007	0.0005 \pm 0.0002	0.0005 \pm 0.0001	100.9
Pb	0.002	0.019 \pm 0.003	0.019 \pm 0.002	98.1

*in brackets indicative values

Table 2. Essential trace and toxic element concentrations in conventional cheese depending on presence/absence of smoking process.

	smoked	no-smoked	RMSE	P
Co	3,30	4,75	2,00	ns
Cr	89,4	101,4	80,1	ns
Cu	426	561	311	ns
Fe	4196	4178	2171	ns
I	156	209	92	ns
Mn	510	719	596	ns
Mo	135	140	44	ns
Ni	29,7	58,1	40,2	ns
Se	558	514	128	ns
Zn	56611	56737	7828	ns
As	4,61	4,16	2,03	ns
Cd	2,49	2,07	2,00	ns
Pb	10,0	13,3	9,4	ns

RMSE = root mean square error

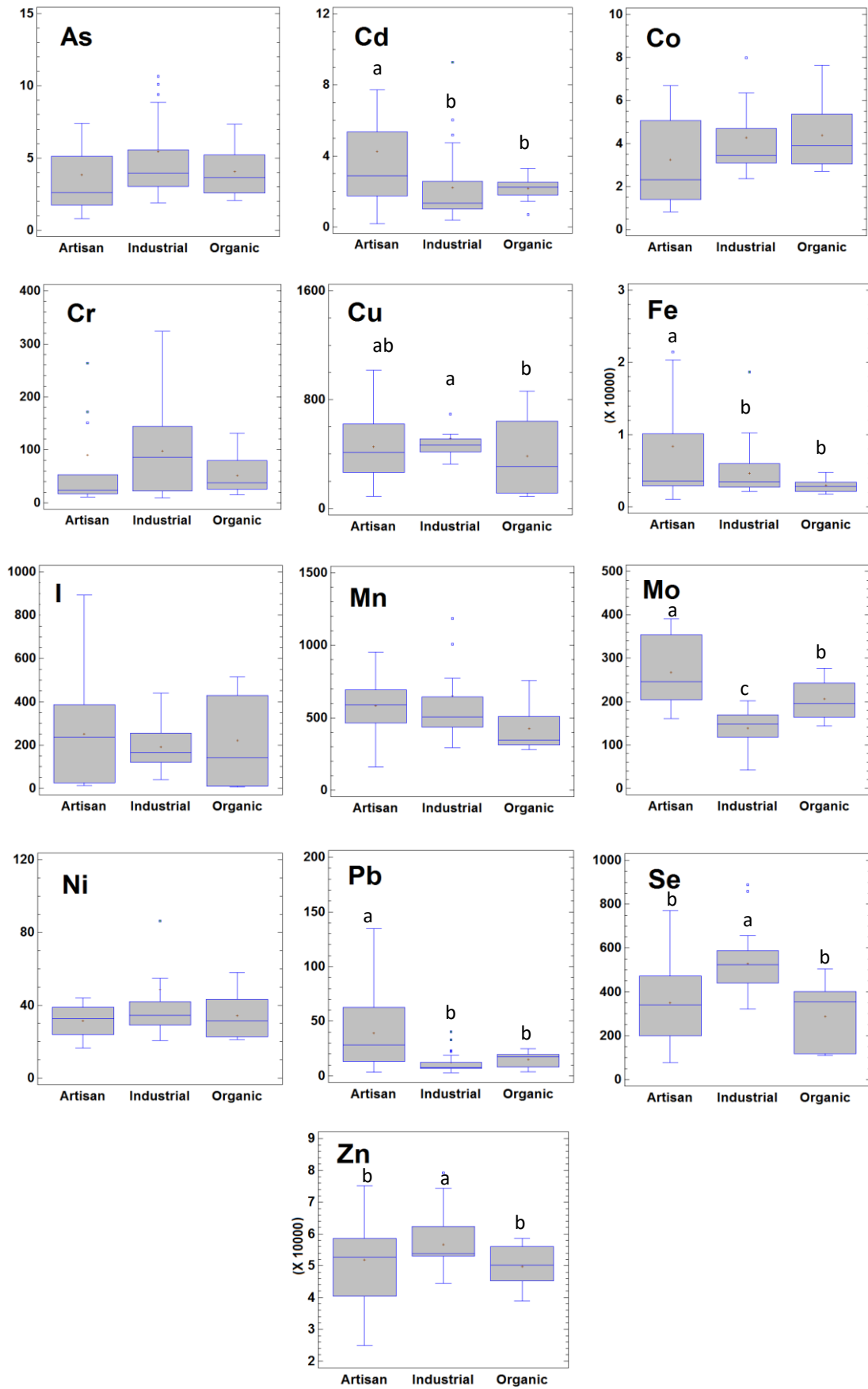


Figure 1. Box-whisker plot for each metal and trace elements analyzed according to the cheese type: Industrial, Artisan and Organic.

6. Atividades de pesquisa realizadas durante o período de bolsa

Formação acadêmica/titulação (Brasil)

Durante os anos de 2016 até o presente momento foram cursadas as disciplinas referentes ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária na Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), instituição federal localizada no município de Recife-PE. Com o objetivo de obter o título de Dr. em Medicina Veterinária previsto para o dia 22/02/2020, com a defesa de tese intitulada: Metais essenciais e pesados: Suas concentrações no queijo tipo “coalho” na bacia leiteira do Agreste Pernambucano, nos estabelecimentos comerciais dos mercados público da cidade do Recife e em queijos artesanais da região da Galícia (Espanha), com a orientação do prof.º Dr. Pierre Castro Soares (Prof.º do departamento e pós-graduação em Medicina Veterinária) e co-orientação do Dr. José Augusto Bastos Afonso da Silva (Técnico da Clínica de Bovinos de Garanhuns-CBG/UFRPE). Além da co-orientação das professoras Dra. Marta Inés Miranda Castañon e Dra. Maria Marta López-Alonso, ambas professoras da Universidade de Santiago de Compostela – *Campus Terra* (USC/Lugo – Espanha).

Pós-Graduação (Doutorado Sanduíche) (Espanha)

Durante o período de outubro de 2018 até maio de 2019 (totalizando 8 meses), foram desenvolvidas atividades referentes ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Sanidade Veterinária na Universidade de Santiago de Compostela – *Campus Terra* (USC/Lugo – Espanha), instituição federal localizada no município de Lugo-Galícia. Foram desenvolvidas atividades laboratoriais, treinamentos em equipamentos de alto desempenho e procedimentos analíticos. Além de serem acompanhadas as atividades no Hospital Veterinário Universitário Rof Codina, acompanhamento das atividades no departamento de patologia animal e visitas à campo em propriedades de produção de ruminantes. Foram realizadas coletas de material (queijos artesanais) para análise de metais essenciais e pesados, com a orientação das professoras Dra. Marta Inés Miranda Castañon e Dra. Maria Marta López-Alonso, ambas professoras da Universidade de Santiago de Compostela – *Campus Terra* (USC/Lugo – Espanha).

Artigos completos publicados em periódicos

1. SOARES, P. C.; SILVA NETO, I. F.; GOUVEIA, L. N. F.; SILVA, T. G. P.; FILHO, E. F. O.; CARVALHO, F. F. R.; BATISTA, A. M. V.; LIMA JUNIOR, D. M.; CARDOSO, D. B. Metabolic dynamics of native lambs fed with Tifton 85 hay or Maniçoba hay associated with the spineless cactus. *ARQUIVO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA (ONLINE)*, v. 72, p. 215-223, 2020.
2. SOUTO, R. J. C.; AFONSO, J. A. B.; MENDONCA, C. L.; DANTAS, A. F. M.; CAJUEIRO, J. F.; GONCALVES, D. N. A.; OLIVEIRA FILHO, E. F.; SOARES, P. C. Biochemical, endocrine, and histopathological profile of liver and kidneys of sheep with pregnancy toxemia. *PESQUISA VETERINARIA BRASILEIRA*, v. 39, p. 780-788, 2019.
3. COSTA, C. A.; SILVA JUNIOR, R. A.; HIGINO, B. S. S.; MENEZES, R. P.; SILVA, A. A. A.; CORREIA, F. R.; OLIVEIRA FILHO, E. F.; PESSOA, R. A. S.; BARTOLOMEU, C. C.; SOARES, P. C. Influence of Concentrate in the Diet on the Metabolic, Biochemical, and Endocrine Profile of Buffalo Heifers. *OPEN JOURNAL OF VETERINARY MEDICINE*, v. 09, p. 79-90, 2019.
4. SOARES, G. S. L.; RIBEIRO, A. C. S.; CAJUEIRO, J. F.; OLIVEIRA FILHO, E. F.; SOARES, P. C.; MENDONCA, C. L.; AFONSO, J. A. B. Cardiac biomarkers and blood metabolites in cows with clinical ketosis. *SEMINA. CIÊNCIAS AGRÁRIAS (ONLINE)*, v. 40, p. 3525-3540, 2019.
5. SOUZA, L. M.; MENDONCA, C. L.; ASSIS, R. N.; OLIVEIRA FILHO, E. F.; GONCALVES, D. N. A.; SOUTO, R. J. C.; SOARES, P. C.; AFONSO, J. A. B. CARDIAC BIOMARKERS TROPONIN I AND CK-MB IN EWES AFFECTED BY PREGNANCY TOXEMIA. *SMALL RUMINANT RESEARCH*, v. 177, p. 97-102, 2019.
6. FILHO, Emanuel Felipe de Oliveira; SOARES, P. C.; MIRANDA, M. I.; AFONSO, J. A. B.; MENDONCA, C. L.; SOUTO, R. J. C.; GONCALVES, D. N. A.; DANTAS, A. F. M.; KUNST, T. H.; PAIM, A. P. S. ; LOPEZ-ALONSO, M. . Outbreak of enzootic ataxia in

lambs in the semi-arid state of Pernambuco, Brazil. *Revista Agrária Acadêmica*, v. 2, p. 18-26, 2019.

7. GONCALVES, D. N. A.; SOARES, P. C.; OLIVEIRA FILHO, E. F.; MESQUITA, E. P.; GUIDO, S. I.; PEIXOTO, D. S.; SILVA JUNIOR, R. A.; BARTOLOMEU, C. C.; AMORIM, M. J. A. A. L. Metabolic profile of Moxotó breed goats during the gestation, delivery and postpartum periods. *Revista Agraria Academica*, v. 2, p. 27-40, 2019.

8. GONCALVES, D. N. A.; OLIVEIRA FILHO, E. F.; SOARES, P. C.; CORREIA, F. R.; MARQUES, A. V. S.; MENEZES, R. P.; SILVA, A. A. A.; HIGINO, B. S. S. Concentração hepática de cobalto em caprinos e ovinos criados no Sertão pernambucano, Brasil. *Revista Agrária Acadêmica*, v. 2, p. 177-185, 2019.

9. COUTINHO, L. T.; MENDONCA, C. L.; SOARES, G. S. L.; OLIVEIRA FILHO, E. F.; SOUTO, R. J. C.; CAJUEIRO, J. F.; SOUZA, M. I.; SILVA, N. A. A.; COSTA, N. A.; SOARES, P. C.; AFONSO, J. A. B. Avaliação da bioquímica sanguínea de vacas leiteiras acometidas por desordens digestivas de natureza mecânica. *Revista Agrária Acadêmica*, v. 2, p. 89-100, 2019.

10. GONCALVES, D. N. A.; SOARES, P. C.; OLIVEIRA FILHO, E. F.; MENDONCA, C. L.; AFONSO, J. A. B.; CARVALHO, F. F. R.; SOUZA, A. F.; SILVA, A. A. A.; PONTES, R. M.; CARVALHO, C. C. D. Concentração sérica de troponina I e fração miocárdica da creatinaquinase (CK-MB) em cabras leiteiras no periparto. *Revista Agraria Academica*, v. 2, p. 158-170, 2019.

11. SILVA, T. R.; SOARES, P. C.; DANTAS, A. F. M.; MARQUES, A. V. S.; FILHO, E.F.O.; AGUIAR, G. M. N.; MARQUES, A. L. A.; RIET-CORREA, F. Serum and liver copper, iron, molybdenum and zinc concentration in goats and sheep in the state of Paraíba, Brazil. *PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA (ONLINE)*, v. 38, p. 1313-1316, 2018.

12. Andrade. H.M.L.S.; NUNES, A. P.; SANTOS, B.; OLIVEIRA FILHO, E. F.; ARAUJO, E. M.; BORGES, J. M.; SANTOS, L. A. O.; PINHEIRO, L. H. S.; OLIVEIRA, L. M.; ANJOS, M. M. S.; BALENSIFER, P. H.; COELHO, R. B.; MOLICA, R. J. R.; ANDRADE,

L. P. AGROFAMILIAR: construindo conhecimentos e semeando a Agroecologia.. Revista Brasileira de Agroecologia (Online), v. 13, p. 155-167, 2018.

13. SILVA, L. T. R.; FILHO. E.F.O.; KUNST, T. H.; ROLIM, V. P. M.; SILVA, J. S. A. E.; REGUEIRA, R. F. S.; PAIM, A. P. S.; SOARES, P. C.; OLIVEIRA, A. A. F. Heavy Metal Concentrations in Free-Living Southern Caracaras (*Caracara plancus*) in the Northeast Region of Brazil.. ACTA SCIENTIAE VETERINARIAE (ONLINE), v. 45, p. 1-8, 2017.