

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
INSTITUTO DE QUÍMICA

MON
543.42
D978p
TES/mem

**PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS PARA PREPARO DE
AMOSTRAS DE LEITE COM ÊNFASE À DETERMINAÇÃO
DE CÁLCIO E MAGNÉSIO POR ESPECTROMETRIA DE
ABSORÇÃO ATÔMICA POR CHAMA**

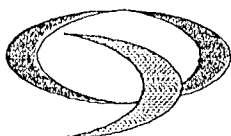
Autor: Mauro José Alves Dutra

SISBI/UFU



1000215801

Orientadora: Nívia Maria Melo Coelho



Programa de Pós Graduação em Química- MESTRADO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Química

e-mail: cpqquimica@ufu.br

Fone/Fax: 3239-4385

1011
543.42
D978p
TES

ALUNO: MAURO JOSÉ ALVES DUTRA

NÚMERO DE MATRÍCULA: 5022403-1

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA ANALÍTICA

PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA: NÍVEL MESTRADO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

“Procedimentos Analíticos para Preparo de Amostras de Leite com Ênfase à Determinação de Ca e Mg por Espectrometria de Absorção Atômica por Chama”

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. NÍVIA MARIA MELO COELHO

A Dissertação foi **APROVADA** em apresentação pública realizada no Anfiteatro do Bloco “E” do Campus Santa Mônica no dia 01 de outubro de 2004 às 13:00 horas, tendo como Banca Examinadora:

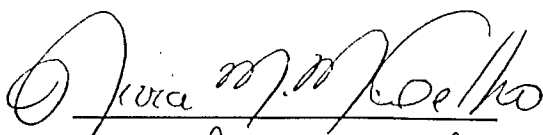
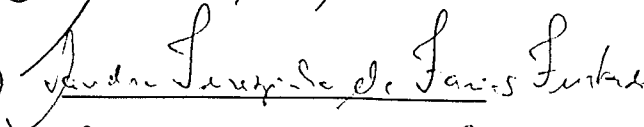
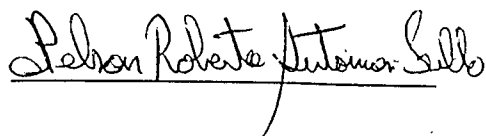
NOME:

ASSINATURA:

Prof^a. Dr^a. Nívia Maria Melo Coelho (IQ/UFU)
(Universidade Federal de Uberlândia)

Prof^a. Dr^a. Sandra T. de Farias Furtado (IQ/UFU)
(Universidade Federal de Uberlândia)

Prof. Dr. Nelson Roberto Antoniosi Filho (IQ)
(Universidade Federal Goiás/GO)

Uberlândia, 01 de outubro de 2004.

A Deus,
“Deus, ao mesmo tempo um nome estereotipado e uma imagem
multiforme, muda segundo cada mente e momento.
Porém em toda mente existe um Deus...
Particular, necessário!

À esposa Arlete e meus filhos: Dávisson Humberto, Anna Paula e Pedro Henrique.

“Foste presença na minha solidão ... Mas respeitaste profundamente a minha maneira única de amar. A tua presença, a tua companhia o teu sorriso, as tuas palavras e mesmo a tua ausência foram expressão de amor profundo. Quando eu sofria, sofrias comigo, e, fez-me entender que o amor é irmão gêmeo da dor, e experimentei a alegria de uma renúncia, alegria que jamais havia experimentado”.

In memoriam: meus pais

“Desejei tê-los comigo nesse momento,
para dividirmos minha alegria, porém tua presença
sempre se fará sentir, pois sou a continuidade do
teu brilho”.

À minha orientadora, Professora Dra. Nívia Maria Melo Coelho,

“A você, que não esqueceu que também senti a mesma ansiedade
que agora experimento.

A você, que com sua experiência, me fez ver que
poderia encontrar o caminho certo.

A você que soube ser mestre e, acima de tudo, uma
grande amiga meus agradecimentos”.

À Professora Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado

“O mestre que caminha à sombra do templo rodeado de
discípulos não dá de sua sabedoria, mas sim de sua fé e
de sua ternura”.

Gran Khalil Gibran

À Professora Dra. Daniele Minholo dos Santos,

“As pessoas que vencem neste mundo, são as que procuram as
circunstâncias de que precisam, e quando não
as encontram, as criam”.

AGRADECIMENTOS

- A Deus: Agradecemos aquele que nos iluminou e nos deu forças para subirmos mais esse degrau em nossas vidas. Ao Deus Nosso. Obrigado!
- Aos meus pais pelo dom mais precioso do universo: a vida.
- A minha esposa Arlete e filhos: Dávisson Humberto, Anna Paula e Pedro Henrique que compartilharam meus ideais e me incentivaram a prosseguir na jornada, fossem quais fossem os obstáculos.
- À irmã Sebastiana que simplesmente, fez do meu ideal o seu objetivo, que olhou comigo na mesma direção e sentido, que me incentivou a prosseguir...”
- Aos meus alunos que participaram da minha luta, minha homenagem e o tributo de minha gratidão.
- Ao funcionários Ildo e Otávio: “A vida sempre nos leva a caminhos diferentes e embora não tenhamos certeza de nos reencontrarmos, suas lembranças sempre permanecerão inapagáveis para mim”.
- A Izabel, pela amizade e colaboração.
- Aos membros da Comissão Examinadora, obrigado, por suas sugestões e críticas, valiosas para o meu crescimento.
- Ao meu amigo professor Mário Calil Sobrinho obrigado, pela correção ortográfica do presente trabalho.
- A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, colaboraram na execução desse trabalho.
- A todos os colegas de laboratório, em especial à professora Cleuzinha, pela ajuda e estímulo nas horas mais difíceis.

Sumário

1 – INTRODUÇÃO	1
2 – OBJETIVOS	4
3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 – Teorias dos microondas	5
3.2 – Forno de Microondas	5
3.3 – Constituição e funcionamento de um forno de microondas	6
3.4 – O uso do forno de microondas para o preparo de amostras.....	7
3.5 – Análise direta de suspensões de leite	10
3.6 – Fluidos Biológicos	15
3.6.1 – Leite	15
3.6.1.1 – Definição do leite bovino.....	15
3.6.1.2 – Propriedades físico-química do leite	18
3.6.1.3 – Produção de leite no Brasil	19
3.7 – Os minerais estudados	21
3.7.1 – Cálcio e Magnésio	21
3.7.2 – Cálcio e Magnésio no organismo humano	22
3.7.3 – Determinação de cálcio e magnésio em amostras biológicas	24
4 – PARTE EXPERIMENTAL	26
4.1 – Instrumentos e acessórios	26
4.1.1.– Reagentes e soluções.....	26
4.2. – Metodologia	28
4.2.1 – Calibração do forno de microondas e distribuição da microondas no interior do forno	28
4.2.2 – Digestão das amostras de leite em forno de microondas.....	31
4.2.3 – Digestão das amostras de leite pelo método convencional.....	33
4.2.4 – Preparo das amostras de leite com soluções de aminas.....	33
4.2.5 – Condições experimentais empregadas nas determinações de Ca e Mg.....	35

5 – RESULTADOS E DISCUSSÕES	36
5.1 – Forno de microondas para preparo das amostras.....	36
5.1.1 – Calibração do forno de microondas e investigação da distribuição das microondas no interior do forno.....	36
5.1.2 – Avaliação do efeito do volume das amostras de leite digeridas no forno de microondas	43
5.1.3 – Avaliação do efeito tempo de digestão das amostras de leite digeridas no forno de microondas	47
5.2 – Amostragem direta	50
5.2.1 – Estudo do efeito de solução de MEA (Monoetanolamina) e ácido cítrico no preparo das amostras de leite.....	51
5.2.2 – Estudo do efeito de soluções de TRIS (Tris-hidroxi-metil-amino- metano) e ácido cítrico no preparo das amostras de leite	62
5.3 – Validação da Metodologia	72
 6 – CONCLUSÃO	 75
 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 76

Índices de Tabelas

Tabela 1 .	Composição do leite de diferentes procedências	16
Tabela 2 .	Teores de constituintes no leite normal e no leite infectado de vaca	17
Tabela 3 .	Distribuição do cálcio nos líquidos corporais ou tecidos	22
Tabela 4 .	Quantidade dietética recomendada de cálcio e magnésio	23
Tabela 5 .	Programas de aquecimento para digestão de amostras de leite em forno de microondas PROVECTO DGT- 100	32
Tabela 6 .	Características físicas e químicas da aminas	34
Tabela 7 .	Condições instrumentais empregadas na determinação de Ca e Mg.....	35
Tabela 8 .	Níveis de potência do forno de microondas utilizado.....	36
Tabela 9 .	Variação da massa de água em função das posições dos frascos de polietileno na plataforma do forno de microondas.....	39
Tabela 10 .	Variação da massa de água em função das posições dos frascos de polietileno à 6,5 cm de altura acima da plataforma do forno de microondas.....	41
Tabela 11 .	Variação da massa de água em função das posições dos frascos de polietileno à 13,0 cm de altura acima da plataforma do forno de microondas.....	43
Tabela 12 .	Efeito da concentração de MEA na determinação de Ca e Mg mantendo volume constante para a solução de MEA + ác. cítrico.....	58
Tabela 13 .	Efeito da concentração do ác. cítrico na determinação da concentração de Ca e Mg.....	59
Tabela 14 .	Efeito da concentração de TRIS na determinação de Ca e Mg mantendo constante o volume da solução de TRIS + ác. cítrico.....	69
Tabela 15 .	Comparação de procedimentos para determinação de cálcio e magnésio em amostras de leite.....	73
Tabela 16 .	Estudos de recuperação para determinação de cálcio em leite	73
Tabela 17 .	Estudos da recuperação para determinação de magnésio em leite	74
Tabela 18 .	Parâmetros de comparação utilizando os procedimentos analíticos	74

Índices de Figuras

Figura 1 .	Esquema de um forno de microondas	07
Figura 2 .	Posicionamento dos frascos de PTFE de acordo com as alturas investigadas	30
Figura 3 .	Posicionamento dos frascos de polietileno no interior do forno de microondas.....	31
Figura 4 .	Curva de calibração obtida para o forno de microondas	37
Figura 5 .	Superfície de resposta obtida pela perda de água contida nos frascos de polietileno distribuídos na base do forno de microondas.....	38
Figura 6 .	Superfície de resposta obtida pela perda de água contida nos frascos de polietileno distribuídos a 6,5cm de altura no forno de microondas	40
Figura 7 .	Superfície de resposta obtida pela perda de água contida nos frascos de polietileno distribuídos a 13,0 cm de altura no forno de microondas	42
Figura 8 .	Efeito do volume de amostra no preparo das amostras e utilizando forno de microondas na determinação de Ca	45
Figura 9 .	Efeito do volume de amostra no preparo das amostras e utilizando forno de microondas na determinação de Mg	46
Figura 10 .	Efeito do tempo de digestão no preparo das amostras e utilizando forno de microondas na determinação de Ca.....	48
Figura 11 .	Efeito do tempo de digestão no preparo das amostras e utilizando forno de microondas na determinação de Mg.....	49
Figura 12 .	Efeito do volume da solução de MEA + ác. cítrico na determinação de Cálcio. Concentração de MEA = 3,0 mol.L ⁻¹	52
Figura 13 .	Efeito do volume da solução de MEA + ác. cítrico na determinação de Magnésio. Concentração de MEA = 3,0 mol.L ⁻¹	53
Figura 14 .	Efeito do volume da solução de MEA + ác. cítrico na determinação de Cálcio. Concentração de MEA = 6,0 mol.L ⁻¹	54
Figura 15 .	Efeito do volume da solução de MEA + ác. cítrico na determinação de Magnésio. Concentração de MEA = 6,0 mol.L ⁻¹	55
Figura 16 .	Efeito do volume da solução de MEA + ác. cítrico na determinação de Cálcio. Concentração de MEA = 12,0 mol.L ⁻¹	56

Figura 17 .	Efeito do volume da solução de MEA + ác. cítrico na determinação de Magnésio. Concentração de MEA = $12,0 \text{ mol.L}^{-1}$	57
Figura 18 .	Efeito da concentração de ácido cítrico na determinação de Cálcio utilizando MEA = $6,0 \text{ mol.L}^{-1}$	60
Figura 19 .	Efeito da concentração de ácido cítrico na determinação de Magnésio utilizando MEA = $6,0 \text{ mol.L}^{-1}$	61
Figura 20 .	Efeito do volume de TRIS + ác. cítrico na determinação de Cálcio Concentração de TRIS = $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$	63
Figura 21 .	Efeito do volume de TRIS + ác. cítrico na determinação de Magnésio Concentração de TRIS = $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$	64
Figura 22 .	Efeito do volume da solução de TRIS + ác. cítrico na determinação de Cálcio. Concentração de TRIS = $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$	65
Figura 23 .	Efeito do volume de TRIS + ác. cítrico na determinação de Magnésio. Concentração de TRIS = $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$	66
Figura 24 .	Efeito do volume de TRIS + ác. cítrico na determinação de Cálcio. Concentração de TRIS = $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$	67
Figura 25 .	Efeito do volume de TRIS + ác. cítrico na determinação de Magnésio. Concentração de TRIS = $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$	68
Figura 26 .	Efeito da concentração de ácido cítrico na determinação de Cálcio utilizando TRIS = $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$	70
Figura 27 .	Efeito da concentração de ácido cítrico na determinação de Magnésio utilizando TRIS = $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$	71

Lista de Abreviaturas e Siglas

MEA –	Monoetanolamina
TRIS –	Trishidroximetilaminometano
PTFE –	Politetrafluoretileno
FAAS –	Espectroscopia de Absorção Atômica por Chama
GFAAS –	Espectroscopia de Absorção Atômica por Forno de Grafite
ICP-OES –	Espectroscopia de Emissão Ótica por Plasma Indutivamente Acoplado
ICP-MS –	Espectroscopia de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado
HPLC –	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
TMAH –	Hidróxido de Tetrametilamônio
CFC-C –	Reagente composto por mistura de aminas (trietanolamina e trietilenotetraamina)
L.C.R. –	Líquido Cérebro Espinal
ATP –	Adenosina Trifosfato
ADP –	Adenosina Difosfato
ISE –	Eletrodo Íons Seletivo
ICP –	Plasma Indutivamente Acoplado
ET-AFS –	Espectroscopia de Fluorescência Atômica por Atomização Eletrotérmica
UFC –	Unidade Formadora de Colônia

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de procedimentos analíticos para o preparo de amostras de leite, dando ênfase à determinação de cálcio e magnésio por espectrometria de absorção atômica por chama. Os procedimentos utilizados foram baseados no emprego da irradiação por microondas em forno de microondas com cavidade, a diluição e a amostragem direta de suspensões com soluções contendo misturas de aminas. Tais procedimentos foram comparados com o método convencional e foram feitos estudos de recuperação dos analitos. As variáveis investigadas para otimizar a digestão das amostras de leite por irradiação das microondas, utilizando frascos fechados a pressão elevada e empregando uma mistura digestora composta por ácido nítrico concentrado (2,0 mL) e 1,0 mL de peróxido de hidrogênio 30% (m.v⁻¹), foram: variação do volume da amostra de leite (0,5 a 2,5 mL) e o tempo de atuação das microondas (4 a 20 min). Pelo estudo do volume da amostra de leite, o melhor volume foi de 0,5 mL, a qual fornece um digerido límpido sem glóbulos de gordura e com melhores resultados na determinação de cálcio e magnésio. Com relação ao efeito do tempo de atuação das microondas, o melhor resultado corresponde ao programa P₃, o qual apresenta duração de 12 minutos com intervalos de 3 em 3 minutos e potência de 0 a 650 W com intervalos de programação de 250 W. Com relação à amostragem direta de suspensões com soluções de aminas, Monoetanolamina (MEA) e Trishidroximetilaminometano (TRIS) + ácido cítrico, foram investigadas situações em que se variou a concentração molar de MEA e de TRIS, mantendo constante a concentração molar de ácido cítrico. Para analisar a influência do ácido cítrico, manteve-se constante a concentração molar das aminas MEA e TRIS, variando a concentração molar do ácido cítrico. As aminas MEA e TRIS mostraram-se eficientes no preparo das amostras de leite para análise direta de suspensões, quando utilizou-se solução de MEA + ácido cítrico, respectivamente numa concentração de 6,0 mol.L⁻¹ e 0,20 mol.L⁻¹. Para as soluções de TRIS

+ ácido cítrico as concentrações ideais foram respectivamente, iguais a $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$ e $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$. Os valores obtidos nos estudos de recuperação para o cálcio e o magnésio demonstraram a eficiência dos procedimentos analíticos propostos nesse trabalho. Os valores encontrados variaram de 93 a 98% para o cálcio e de 80 a 97% para o magnésio. Todos os resultados foram submetidos a um tratamento estatístico com emprego do teste “t” pareado. As vantagens encontradas pelos procedimentos desenvolvidos neste trabalho são: utilização de reagentes comerciais e baratos, tempo reduzido de preparo das amostras, 2,0 minutos para as soluções com misturas de aminas e 8,0 minutos para a digestão ácida com emprego das irradiações por microondas, menores possibilidades de contaminação, menores perdas de analitos e a utilização de curvas analíticas empregando soluções padrão aquosas dos analitos. Os procedimentos analíticos investigados podem ser implementados em análise de rotina e a escolha do método deve considerar os equipamentos disponíveis no laboratório e a experiência do analista.

ABSTRACT

The present work had as objective the development of analytical procedures when preparing milk samples, emphasizing the determination of calcium and magnesium by spectrometry of atomic absorption by flame. These procedures were based on the use of microwaves irradiation, the dilution and the direct sampling with solutions containing amino mixtures. Such procedures had been compared with the conventional method. The investigated parameters for optimizing the digestion of milk samples by microwaves irradiation, using closed bottles under high pressure and a digestive mixture containing concentrated nitric acid (2,0 mL) and hydrogenperoxide 30% (m.v⁻¹) 1,0 mL, were: volume variation of the milk sample (0,5 to 2,5 mL) and time of microwaves performance (4 to 20 min). From the volume analysis of the milk samples, the best volume was 0,5 mL, which supplies a limpid digested solution without fatty globules and with better results in the determination of calcium and magnesium. Considering the time of microwaves performance, the best result correspond to the P₃ program, which has a total duration time of 12 minutes (intervals of 3 minutes) and the power variation from 0 to 650 W (intervals of 250 W). Considering the direct sampling of suspensions with the amino solutions – Monoetanolamine (MEA) and Trishidroximetilaminometane (TRIS) + citric acid – various situations were investigated, varying the molar concentration of MEA and TRIS, remaining constant the molar concentration of citric acid. To analyze the influence of the citric acid, the molar concentration of amino MEA and TRIS remained constant, varying the molar concentration of the citric acid. Amino MEA and TRIS were efficient in preparing milk samples for direct analysis of suspensions, when the solution used was MEA + citric acid, respectively in a concentration of 6,0 mol.L⁻¹ and 0,2 mol.L⁻¹. For the solutions of TRIS + citric acid, the ideal concentrations were, respectively, 1,5 mol.L⁻¹ and 0,05 mol.L⁻¹. The values found in the studies of calcium and magnesium recovery had confirmed the efficiency of the considered analytical procedures in this work. These values were 93 to 98% for calcium and 80 to 97% for magnesium. All these results were also submitted to a statistical treatment. The advantages related to the procedures applied in this work are: use of commercial and cheap reagents, reduced time for sample preparing (2 minutes for the solutions with amino mixtures and 8 minutes for the acid digestion using microwaves

irradiation), little possibilities of contamination, little losses of analitos and the use of analytical curves with watery standard solutions. The investigated analytical procedures can be implemented in routine analysis and the choice of the method must consider the available equipment in the laboratory and the experience of the analyst.

1 – INTRODUÇÃO

Uma das operações preliminares de uma análise química consiste em submeter uma alíquota representativa da amostra a um tratamento adequado visando sua preparação para os passos subseqüentes. Esses procedimentos de tratamento dependem da natureza da amostra, dos analitos a serem determinados e sua concentração, do método de determinação e da precisão e exatidão desejadas.

Nos métodos convencionais de análise, as amostras são analisadas na forma de solução (SULCEK & POVONDRA, 1989). Tradicionalmente, a amostra é preparada por meio de métodos de digestão, tais como fusão ou dissolução ácida, sendo que as mesmas levam à uma diluição da concentração do analito na amostra, ocasionando perda em sensibilidade no método analítico; além de provocar contaminação quando não são utilizados reagentes químicos de alta pureza (ARRUDA & MAGALHÃES, 1998).

Dentre todas as operações analíticas, a etapa de preparo das amostras é a mais crítica. Em geral, é nessa etapa que se cometem mais erros, que se consome mais tempo e de alto custo, pois demanda o uso de reagente de alta pureza. Idealmente, um método de digestão de amostra deve apresentar simplicidade, rapidez, baixo custo, utilizar pequenos volumes de solventes, permitir a dissolução de grande número de amostras e finalmente, produzir resultados precisos e exatos.

O preparo das amostras assistidas por microondas atende em grande parte a essas necessidades (ARRUDA & MAGALHÃES, 1998). Existem dois tipos de fornos de microondas que são empregados em laboratório de análises para o preparo de amostras: os que utilizam frascos fechados a pressões elevadas ($8,1 \times 10^4$ a $20,3 \times 10^4$ atm) e os de frascos abertos a pressão atmosférica. Nos sistemas de frascos fechados a energia das microondas é dispersa por toda a cavidade, enquanto que nos sistemas abertos a energia é focalizada na parte do frasco de decomposição contendo a amostra (MINGORANCE et al. 1993; KRUSHEVSKA et al. 1993). Em ambos os sistemas, o tempo de decomposição e os riscos ao operador são bastante minimizados.

Abusamra et al. (1975) e Karanassios et al. (1991) empregando um forno de microondas caseiro e utilizando uma mistura de HNO_3 e HClO_4 , oxidaram amostras biológicas em frascos de erlenmeyer de 125 mL. Desde então, vários trabalhos foram publicados envolvendo o uso da radiação das microondas como fonte de energia para promover a dissolução ácida de vários tipos de amostras (DE LA FUENTE et al. 1997; SILVESTRE et al. 2000; SANTOS et al. 2002). As vantagens oferecidas pela decomposição de amostras com fornos de microondas são amplamente demonstradas e vários métodos são descritos por De La Fuente, (1995a); De La Fuente, (1995b); Coelho, (2000); Santos, (2002).

Uma outra alternativa para o preparo de amostras é através da amostragem de suspensões, na qual a determinação do analito é realizada diretamente. Este método, originalmente empregado por Brady et al. (1974) na determinação de zinco e chumbo em folhas e sedimentos marinhos oferece algumas vantagens quando comparadas às técnicas convencionais de solubilização de amostras. Dentre elas, podem-se citar a minimização dos riscos de contaminação e/ou perdas do analito durante o preparo da amostra e menores quantidades de reagentes são empregados tornando a análise mais eficiente ainda que a curva analítica pode ser obtida, em muitos casos, com o emprego de solução padrão aquosa do analito. Por isso, a técnica das suspensões tem sido usada com sucesso para a análise de vários materiais, dentre estes, amostras de gêneros alimentícios, pigmentos e materiais geológicos (MAGALHÃES & ARRUDA, 1998)

O leite apresenta-se quase indissociável da alimentação de ser humano, principalmente em uma das etapas de seu desenvolvimento. As diversas fases que envolvem a produção, o beneficiamento e a distribuição do leite podem induzir alterações bioquímicas, físico-químicas, analíticas, microbiológicas, nutricionais e sensoriais que podem comprometer a qualidade do produto final. A avaliação química do leite tornou-se muito importante para a garantia da qualidade e do desenvolvimento dos produtos lácteos, sendo que a mesma envolve especialistas em diversas áreas, em razão da complexidade das interações entre os constituintes do leite e os tratamentos tecnológicos empregados.

A determinação da concentração dos analitos presentes no leite é fator determinante para o estabelecimento de sua qualidade nutricional, uma vez que esses podem ser encontrados em altas concentrações tais como, Ca, K, Mg, Na e P e em baixas

concentrações, como, por exemplo, Ba, Cu, Fe, Mn e Zn, sendo que de todos esses analitos, apenas o Ba não é essencial à espécie humana.

Assim, este trabalho apresenta procedimentos analíticos para o preparo de amostras de leite, visando a determinação de cálcio e magnésio por espectrometria de absorção atômica por chama (DUTRA et al. 2004). Os procedimentos utilizados para o tratamento de amostras de leite foram baseados na digestão por via úmida em meio ácido, utilizando um forno de microondas com cavidade, e na amostragem direta de suspensões em meio alcalino, os quais foram comparados com o procedimento convencional.

2 – OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo principal a proposição de métodos para o preparo de amostras de leite visando a determinação de Ca e Mg. Os procedimentos investigados envolveram a digestão das amostras de leite empregando o forno de microondas com cavidade e a diluição das amostras empregando soluções contendo aminas a saber, Monoetanolamina (MEA) + ácido cítrico e Trishidroximetilaminometano (TRIS) + ácido cítrico. Cálcio e magnésio foram quantificados por espectrometria de absorção atômica por chama.

3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 – Teorias das microondas

No espectro eletromagnético, a região das microondas corresponde à faixa de comprimento de onda que vão de $3,0 \times 10^{-1}$ m até $3,0 \times 10^{-4}$ m, isto é de 3,0 dm a 0,3mm, localizando-se entre as radiações do infravermelho e as radiações das ondas de radiofrequência, sendo considerada como exemplo de radiação de baixa frequência, variando entre 30,0 GHz a 300 MHz (CHRISTRIAN, 1986; KINGSTON & JASSIE, 1988). As microondas, em função de sua localização no espectro eletromagnético, podem ser irradiadas, refletidas e também utilizadas para o aquecimento. De acordo com Zlotrynski, (1995), o aquecimento por meio da energia de microondas é um dos mais importantes processos de aquecimento.

O aquecimento de um material devido à irradiação por microondas é o resultado da interação da onda eletromagnética não ionizante com o dipolo elétrico da molécula. Essa interação provoca movimento das espécies em solução pela migração de íons e/ou moléculas polares, provocada pelo altíssimo número de vezes em que o campo eletromagnético se alterna, sendo necessário um sincronismo entre a frequência de relaxação molecular e do campo eletromagnético (BARBOZA et al., 2001).

3.2. Forno de Microondas

Uma alternativa ao preparo de amostras em laboratório é a utilização de fornos de microondas. Existem dois tipos de fornos de microondas: os que utilizam frascos fechados a pressões elevadas ($8,1 \times 10^4$ a $20,3 \times 10^4$ atm) onde a energia é dispersa por toda a cavidade denominado forno de microondas com cavidade e forno de microondas com radiação focalizada com uso de frascos abertos a pressão atmosférica, onde a energia é focalizada na parte do frasco de digestão da amostra. Quando comparamos os dois tipos de forno de microondas, notamos a existência de vantagens e desvantagens. O preparo de

amostras utilizando frascos fechados apresenta como vantagens a não ocorrência de perdas de elementos voláteis, quantidade mínima de reagentes, redução de problemas associados à contaminação da amostra tanto atmosférica como do próprio frasco de preparo, redução do tempo de digestão e decomposição de um grande número de amostras. O preparo de amostras por forno de microondas de radiação focalizada é ideal para amostras com alto teor de matéria orgânica, favorece o uso de volumes ou massas maiores de amostra, adição automática e variedade de reagentes a serem utilizados, bem como o emprego de frascos de quartzo, vidro ou PTFE (COELHO, 2000).

3.3– Constituição e funcionamento de um forno de microondas

Um forno de microondas típico apresenta-se constituído por seis componentes: o magnetron, o guia de ondas, a cavidade do forno, o agitador, o circulador e o exaustor de ar (KINGSTON, 1988)

Um esquema do forno de microondas está apresentado na Figura 1.

O magnetron é uma válvula que gera as microondas, a qual consiste de um dispositivo sob vácuo, que transforma energia elétrica em microondas. Uma diferença de potencial constante é aplicada entre o ânodo e o cátodo. Os elétrons acelerados partem do cátodo em direção ao ânodo, mas a presença de um forte campo magnético, faz com que esses elétrons descrevam uma trajetória curva e sigam um caminho em espiral, produzindo radiofrequência. Posteriormente ocorrerá a emissão de ondas eletromagnéticas por uma antena colocada diretamente sobre o ânodo, sendo que as mesmas serão direcionadas pelo guia de onda até a cavidade, onde o espalhador as distribui em várias direções, sendo, então absorvidas pelas moléculas das amostras a serem digeridas. As paredes metálicas do forno absorvem muito pouco da energia, sendo que a maior parte da mesma é refletida e dissipada em um dispositivo (dummy load), o qual evita que as microondas danifiquem a válvula (KINGSTON, 1988; MINGORANCE et al., 1993).

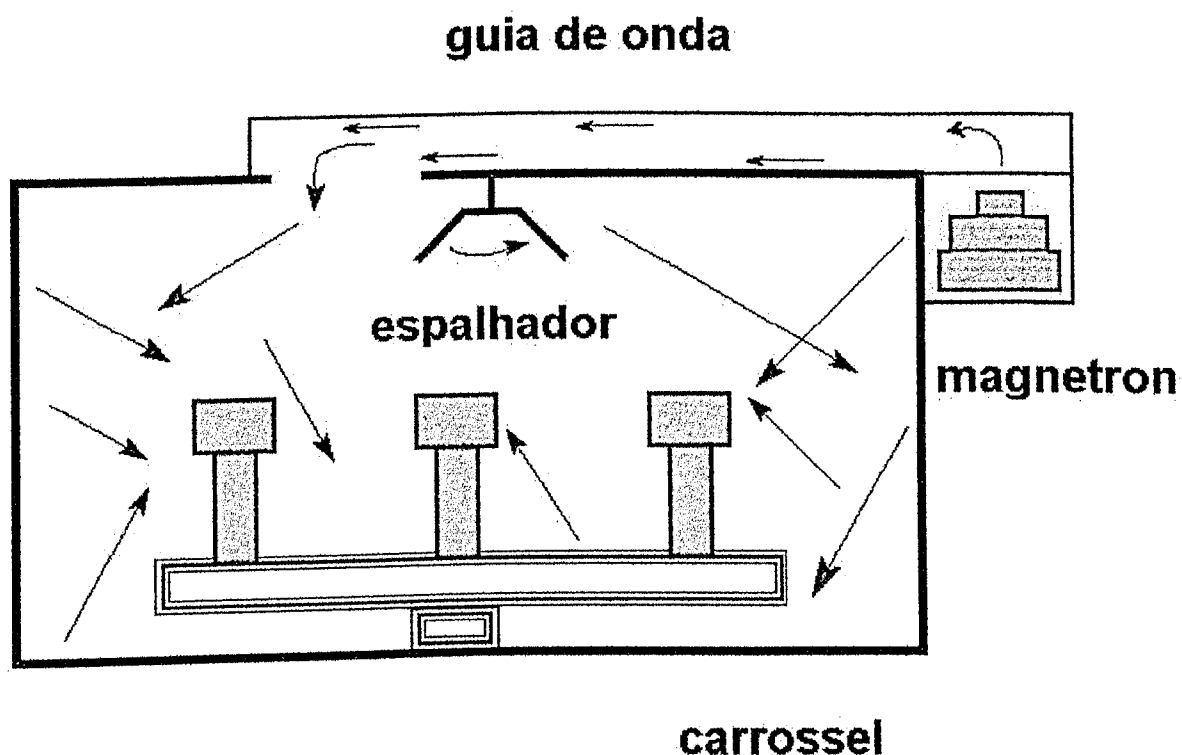


Figura 1. Esquema de um forno de microondas

3.4 – O uso do forno de microondas para o preparo de amostras

Os procedimentos de digestão pelo método convencional (via seca) são morosos, pois envolvem várias etapas, podendo ocorrer problemas causados por contaminações e/ou perda de analitos. Fornos de microondas estão sendo cada vez mais utilizados em Química Analítica para o preparo de amostras, pois reduzem o tempo de preparo das mesmas e minimizam contaminações e/ou perdas.

A maioria das digestões em forno de microondas utiliza uma mistura digestora composta pelo material a ser digerido, ácido nítrico e peróxido de hidrogênio. Abusamra et al. (1995) descreveram o uso de forno de microondas para a dissolução de amostras. Utilizando mistura de ácido nítrico (HNO_3) e ácido perclórico (HClO_4) oxidaram amostras biológicas em frasco de erlenmeyer de 125 mL com emprego de um forno de microondas caseiro. Vários artigos têm sido publicados envolvendo o uso do forno de

microondas para promover a digestão de amostras de fluidos biológicos, dentre eles o leite, com ácido nítrico e peróxido de hidrogênio.

Coni et al. 1990, utilizaram um procedimento com várias etapas para o tratamento de amostras de leite humano. As amostras foram liofilizadas, e em seguida decompostas por via seca, eliminando a umidade residual e, posteriormente, executou-se um aquecimento lento por duas horas, após adição de ácido nítrico concentrado. Em seguida, o resíduo foi calcinado a 400°C dissolvendo-se as cinzas com HNO₃ concentrado a 40°C. A determinação de Al, Cr, Fe, Li, Mg e outros metais nos digeridos do leite foi feita por espectrofotometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite (GFAAS).

Schramel & Hasse (1993) efetuaram a digestão de amostras, utilizando forno de microondas sob alta pressão. As amostras de leite (250 mg) foram digeridas utilizando uma mistura composta por ácido nítrico concentrado (2,0 mL) e ácido perclórico concentrado (0,5 mL), ocorrendo a determinação de Cd e Pb por voltametria de redissolução anódica nos digeridos de leite analisados.

Aziz-Alrahman (1994) realizou digestões de amostras de leite em pó de formulações infantis (1,0 e 1,5 g) com ácido nítrico concentrado (30,0 mL) e peróxido de hidrogênio (5,0 mL) em frascos fechados, levando-se a secura da solução dos digeridos. O resíduo obtido foi dissolvido em solução de HCl (6,0 mol.L⁻¹) originando clorocomplexos dos metais. Os analitos foram eluídos com solução de mistura ácida (0,005 mol.L⁻¹ HCl + 0,07 mol.L⁻¹ HNO₃) e o eluato foi evaporado até a secura, sendo o resíduo dissolvido em uma solução de ácido nítrico (0,014 mol.L⁻¹). Os metais Cu, Fe, Zn, Ca e Mg foram determinados por espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS) sendo estes metais encontrados em concentrações mais altas em formulações infantis quando comparados às amostras de leite bovino.

Evans & Krähenbühl (1994) realizaram a digestão de amostras de leite usando forno de microondas caseiro com emprego de frascos fechados. A mistura digestora foi composta por 2,0 mL de HNO₃ e 1,0 mL de H₂O₂, seguida da determinação do boro por ICP-OES e por ICP-MS nas amostras digeridas.

De La Fuente & Juarez (1995a) utilizaram uma mistura de ácido perclórico e peróxido de hidrogênio concentrado em um forno de microondas com cavidade para digerirem amostras de leite com o objetivo de determinar fósforo através da espectrofotometria de absorção molecular na região do visível. De acordo com os autores a pressão é o principal fator limitante quando se emprega o ácido perclórico em forno de microondas com cavidade.

De La Fuente & Juarez (1995b) determinaram Ca, K, Mg e Na por espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS) em amostras de leite digeridas empregando uma mistura de HNO_3 concentrado e H_2O_2 . Neste estudo os autores utilizaram o método de adição do analito para a determinação do Ca em leite integral (3,6% v.v⁻¹). De acordo com os pesquisadores, isso foi necessário devido à provável associação de 65% do Ca disponível com as micelas de caseína, em consequência de uma digestão parcial das gorduras.

De La Fuente et al. (1997) determinaram Ca, K, Mg e Na por espectrometria de absorção atômica por chama em amostras de leite em pó com a utilização de diferentes misturas de HNO_3 concentrado e H_2O_2 e HClO_4 em um forno de microondas com cavidade. Baixas recuperações foram obtidas para Ca e Mg, pois os mesmos, de acordo com o autores, estavam associados às micelas de caseína, sendo então necessário a adição dos respectivos analitos para as suas quantificações.

Larsen & Ludwigen (1997) utilizando uma mistura de HNO_3 concentrado e HClO_4 concentrado, digeriram amostras de leite em frascos fechados de alta pressão, construídos com aço revestido com PTFE, determinando a concentração de iodo por ICP-MS. Os autores empregaram a mistura ácida para destruir a matéria orgânica e garantir a oxidação do iodo às formas não voláteis e utilizaram frascos fechados para impedir a perda do iodo por volatilização.

Silvestre et al. (2000) utilizaram forno de microondas com frascos fechados para promoverem a digestão de amostras de leite humano com o objetivo de determinarem Cu, Fe e Zn por FAAS, utilizando uma mistura de HNO_3 concentrado e H_2O_2 .

Testes de adição e recuperação foram empregados para avaliar a exatidão na quantificação dos elementos determinados. Alguns digeridos obtidos continham glóbulos

de gorduras suspensos, indicando a ocorrência de digestão apenas parcial dessas amostras. Obteve-se uma digestão mais eficiente quando aumentou o ciclo de aquecimento do programa de digestão desenvolvido.

Ikem et al. (2002) utilizando forno de microondas com cavidade, executaram a digestão de várias amostras de leite empregando HNO_3 concentrado e H_2O_2 . Para 0,5 – 1,0 g de amostra foi usada uma mistura composta por 7,0 mL de HNO_3 e 3,0 mL de H_2O_2 . Elementos tais como Al, Ba, Ca, Cu, Fe, Mg entre outros foram determinados nas amostras digeridas, por ICP-OES.

A grande maioria dos trabalhos relativos às digestões de amostras de leite foram realizadas em forno de microondas com frascos fechados denominados forno de microondas com cavidade, utilizando-se misturas de reagentes ácidos e peróxido de hidrogênio, assim como o proposto no presente trabalho.

3.5. Análise direta de suspensões de leite

O preparo de amostras biológicas se caracteriza principalmente pelo uso de ácidos concentrados, (HNO_3 e HClO_4), com propriedades oxidantes ou complexantes, os quais proporcionam uma excelente digestão da amostra, no entanto, exigem condições de trabalho que garantam a integridade do analista e a segurança do ambiente de trabalho.

O preparo das suspensões é um processo simples e envolve a diluição da amostra com um determinado reagente, proporcionando menores riscos de contaminação e perdas em consequência da mínima manipulação das amostras. Uma das desvantagens no preparo das amostras utilizando as suspensões é a necessidade de se trabalhar com partículas de tamanhos reduzidos. Sabe-se, no entanto, que o tamanho da partícula depende da composição da amostra, o que influencia na estabilização e eficiência de nebulização e atomização do analito contido na respectiva suspensão (MAGALHÃES & ARRUDA, 1998).

Para garantir a representatividade da amostra, a suspensão deverá ser estabilizada e/ou homogeneizada imediatamente antes do início da análise, sendo esse

provavelmente o fator mais crítico na técnica das suspensões. A homogeneização das suspensões pode ser obtida por agitação mecânica da amostra ou pela estabilização das partículas mediante o uso de agentes estabilizantes. A necessidade de empregá-los é consequência direta da taxa de sedimentação do material suspenso. Em soluções aquosas o material sofre uma rápida sedimentação, devido a sua natureza hidrofóbica. (MAGALHÃES & ARRUDA, 1998).

Existem vários compostos (ou misturas deles) descritas na literatura que atuam como agentes estabilizantes, dentre os quais podemos citar o Triton X-100, Viscalex, glicerol, glicerol - água e glicerol - metanol, trietanolamina, trishidroximetilaminometano. (MAGALHÃES & ARRUDA, 1998).

Carrión et al. (1994) prepararam amostras de leite humano com etoxinonilfenol (0,03% m.v⁻¹), conhecido comercialmente como Triton X-100 para a determinação de Ca, Fe, K, Mg e Zn por ICP-OES. O etoxinonilfenol possibilitou a determinação dos respectivos analitos devido à redução do tamanho das gotas do aerossol formado com a suspensão do leite. Para a calibração foram necessárias soluções de referência dos analitos para a curva analítica preparadas com soluções de Triton X-100 (0,03% m.v⁻¹) na mesma concentração da amostra. O agente estabilizante Triton X-100 possibilitou uma melhor homogeneização da amostra, provavelmente devido à redução do tamanho das gotas do aerossol formado com o leite.

Cabrera et al. (1995) promoveram diluições de amostras de leite com o emprego de Triton X - 100 (1,0 v.v⁻¹) e adição de esferas de zircônia para agitação até a suspensão ser formada. Retiraram as esferas da suspensão utilizando um funil de Büchner e, com adição de uma emulsão de silicone antiespumante, garantiram que aproximadamente 90% das partículas a serem nebulizadas tivessem um diâmetro menor que 25µm. Foram investigados os efeitos provocados pelo aumento da massa das amostras, tempo de agitação, concentrações e volumes das soluções de Triton X-100 no preparo e estabilização das suspensões. Os resultados obtidos na determinação dos analitos foram comparados com as determinações em amostras digeridas (0,2g) em forno de microondas com cavidade utilizando 2,5 mL de HNO₃ e 35,0 mg de V₂O₅ como catalisador. Diversos

analitos foram determinados, porém, para a determinação do Pb nas suspensões foi necessário o uso de métodos de adições do analito.

Mckinstry et al. (1999) analisaram amostras de leite por ICP-OES, adicionando água quente a 25,0 mL de leite, e após resfriamento acrescentou-se o padrão interno contendo lutécio ($2,0 \text{ mg.L}^{-1}$) e 250,0 μL de solução de Triton X – 100 (10% v.v⁻¹), diluindo a suspensão para 250 mL de água e fizeram determinação de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na e P. Em função da instabilidade da suspensão, o que ocasionou uma precipitação parcial, foram obtidas baixas recuperações de Ca e Mg.

Bermejo et al. (2000) determinaram vanádio em diversos tipos de amostras de leite por GFAAS utilizando procedimento de pré-concentração. Foram injetados no tubo de grafite pré-aquecido a 110°C, três alíquotas sucessivas de amostras de leite (30,0 μL cada alíquota) as quais já haviam sido diluídas com solução de Triton X- 100 (10% v.v⁻¹). Após cada introdução empregaram uma etapa de secagem (110°C) e pirólise (1500°C). Para a determinação do vanádio foi necessário o emprego do método das adições do analito. Em outro trabalho Bermejo et al. (1997) determinaram Fe e Zn diretamente em amostras de diversos tipos de leite bovino (integral, desnatado) por FAAS.

Abollino et al. (1998) utilizando de um simples pré-tratamento da amostra de leite bovino com precipitação da caseína por uma solução tampão do acetato seguida de filtração, determinaram a concentração de Cu e Mn. Empregou-se também a técnica de FAAS para uma comparação com os resultados obtidos com o uso da técnica de ICP-OES. Pela análise dos resultados obtidos, concluiu-se que o Cu está distribuído no leite na forma de cátion ou ligado à caseína, e outros analitos, Ca, Mg, Al, Fe, na forma catiônica.

Silva et al. (2001) investigaram a associação de Ca, Fe, Mg e Zn com as proteínas do leite utilizando dois processos para o preparo de amostras de leite. No primeiro procedimento realizaram uma hidrólise enzimática adicionando à amostra de leite uma solução contendo pepsina. Então, a solução homogeneizada resultante foi mantida a 37°C por 24 horas sendo centrifugada e filtrada. No segundo procedimento empregaram a precipitação da proteína (caseína) utilizando ácido tricloroacético. A solução resultante da mistura do ácido foi homogeneizada e após 24 horas foi centrifugada. Nos dois processos obtiveram recuperações quantitativas de Ca, Mg e Zn, concluindo que Mg e Zn estão

principalmente associados as partículas coloidais de ortofosfato de cálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), as quais fazem parte da estrutura das micelas de caseína.

Amostras de leite podem ser preparadas em meio alcalino, sendo, no entanto, pouco utilizado, pois o mesmo é empregado para aplicações analíticas mais restritas, uma vez que este favorece a hidrólise de cátions.

Foram publicados trabalhos que utilizaram extrações em meio alcalino (KNAPP et al. (1998); RÄDLINGER & HEUMANN (1998); GÉLINAS et al. (1998) com o uso de frascos de combustão com oxigênio, empregando uma solução absorvedora alcalina.

Gélinas et al. (1998) e outras publicações Nóbrega et al. (1997); Hua et al. (2000); Sturup & Büchert (1996); Baumann (1990) utilizaram-se de procedimentos simples envolvendo a diluição do leite com reagentes em meio alcalino.

Sturup & Büchert (1996) fizeram a determinação de cobre e iodo utilizando de amostras diluídas com uma mistura de hidróxido de potássio ($0,05 \text{ mol.L}^{-1}$) e hidróxido de tetrametilamônio ($0,07 \text{ mol.L}^{-1}$) empregando sistema de análise por injeção em fluxo (FIA) acoplado ao ICP-MS fizeram a determinação do cobre e iodo. Os autores comentaram a necessidade da maior diluição para evitar efeitos de matriz, prejudicando a precisão na determinação de iodo, devido às concentrações medidas estarem próximas ao limite de detecção. A determinação dos elementos foi realizada empregando o método das adições de analito. Tentativas de determinar Al, As, Cr, Ni, Cd, Se e Pb não foram bem sucedidas devido à interferência poliatômicas ou a insolubilidade dos elementos em meio alcalino.

Radlinger & Heumann (1998) determinaram a concentração de iodo em amostras de leite. O iodo foi extraído utilizando solução de hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) em frascos fechados por 3 horas a 90°C . Para comparação usaram um procedimento de digestão em forno de microondas com cavidade empregando uma mistura contendo ácido nítrico (1,5 mL) e ácido perclórico (1,0 mL) para amostras de 0,1 a 0,8 g. Os autores comentaram que pode ser necessário filtrar a solução da amostra extraída com TMAH, dependendo do tipo de nebulizador usado, devido à presença de partículas não dissolvidas.

Nóbrega et al. (1997) determinaram Ca, K, Mg, Na, P e Zn em amostras de leite utilizando o reagente CFA-C, composto por uma mistura de aminas (trietanolamina e trietilenotetraamina). De acordo com os autores esse reagente dissociaria parcial ou totalmente as micelas da caseína e estabilizaria os cátions em fase líquida, pois após a diluição foram obtidas suspensões límpidas e incolores para amostras de leite. Soluções de referência foram preparadas em meio contendo 10% v.v⁻¹ CFA-C. A quantificação dos elementos por ICP-MS foi realizada utilizando-se o método das adições de analito com ítrio sendo adicionado como padrão interno.

Gélinas et al.; (1998) determinaram iodo em vários materiais de referência incluindo leite em pó, leite integral e desnatado, utilizando solução de CFA-C em banho ultra-sônico por 30 minutos. Esses pesquisadores comentaram que esse reagente comercial, CFA-C (trietanolamina e trietilenotetraamina), apresenta ação complexante. Empregando o procedimento de extração obtiveram resultados concordantes com o valor certificado para a determinação de iodo em amostras de leite e formulações infantis.

Aleixo (2000) realizou a determinação direta de ferro e selênio em leite por GFAAS, utilizando CFA-C, 10% (v.v⁻¹) para amostras de leite diluídas. Esse reagente empregado, evita o acúmulo de gordura no capilar do amostrador e melhorando a repetibilidade do sinal analítico.

Santos et al. (2002) estudaram e desenvolveram procedimentos para o preparo de amostras de leite, utilizando forno de microondas com radiação focalizada utilizando mistura digestora composta por ácido nítrico concentrado, ácido sulfúrico concentrado e peróxido de hidrogênio. Outros dois procedimentos investigados foram a diluição em linha e em batelada com solução de CFA-C e com misturas contendo aminas e ácido cítrico, sendo que as misturas de aminas são mais simples, rápidos e de menor custo. Portanto, em substituição ao reagente CFA-C preparam-se soluções contendo monoetanolamina (MEA) com ácido cítrico e soluções contendo trishidroximetilaminometano (TRIS) com ácido cítrico. Ambos reagentes possibilitaram a diluição 1 + 1 (v.v⁻¹) de amostras de leite com diferentes teores de gordura. Não ocorreram problemas causados por impregnações de partículas de gordura no nebulizador ou na câmara de nebulização mesmo após uma sessão ininterrupta de trabalho de 8 h.

Concluíram que as misturas propostas podem ser utilizadas como uma alternativa ao reagente CFA-C pra o pré-tratamento de amostras de leite. Observou-se também uma melhoria na qualidade do branco analisado. Utilizando-se desses dois procedimentos, digestão da amostra no forno de microondas e amostragem direta por suspensão do leite com emprego de soluções de aminas, determinaram as concentrações de Ca, K, Mg, Na, P e Zn por ICP-OES.

3. 6. Fluidos Biológicos.

3. 6. 1. Leite.

Embora alguns organismos vivos apresentam restrições ao uso do leite, o mesmo consiste no alimento mais completo de que se pode dispor para o ser humano. É um dos grandes responsáveis pelo crescimento e saúde das crianças, preenchendo a totalidade das necessidades de proteínas das crianças com até 02 anos de idade, 60% da necessidade de adolescentes e 40% de adultos.

Para que se tenha um bom desenvolvimento, a dose diária dever ser (GUIMARÃES, 2003):

Crianças: 3 a 4 copos/dia

Adultos: 2 a 3 copos/dia

Mulher gestação/amamentando: 4 a 6 copos/dia

O leite embora traga diversos benefícios, pode também causar muitos problemas se não tiver o necessário cuidado com o mesmo durante a ordenha, o transporte e conservação posterior. Isto inclui seu tratamento nas usinas de beneficiamento, na estocagem, no comércio, nos balcões de supermercados e na sua distribuição.

3. 6. 1. 1. Definição do leite bovino

Existem diversas definições do leite, cada uma delas elaboradas por um ou mais pesquisadores e considerando o leite sob determinados pontos de vista.

Do ponto de vista higiênico, pode-se definir o leite como sendo: “produto íntegro, da ordenha total e sem interrupção, devendo ser ordenhado e acondicionado em condições higiênicas e sem conter colostro” (GUIMARÃES, 2003).

Do ponto de vista analítico, o leite é um fluido biológico com uma matriz coloidal complexa, contendo elevado teor de gordura que dificulta a determinação direta dos constituintes inorgânicos por técnicas eletroanalíticas ou espectroanalíticas convencionais (JENSEN, 1995).

A Tabela 1 apresenta a composição do leite de diferentes procedências sendo que estas podem variar de acordo com os seguintes fatores: raça, período de lactação, alimentação, saúde, período de ordenha, características individuais, clima, espaço entre as ordenhas e estações do ano (GUIMARÃES, 2003).

Tabela. 1. Composição do leite de diferentes procedências

Componentes Espécie	Densidade g. ml ⁻¹	Água %	Proteínas %	Gorduras %	Lactose %	Matéria seca %	Sais min. %
Búfala	1,034	82,05	4,00	7,98	5,18	17,95	0,79
Cabra	1,032	87,54	3,70	4,20	4,00	12,46	0,56
Égua	1,031	88,80	2,70	2,50	5,50	11,20	0,50
Jumenta	1,033	90,45	1,70	1,55	5,80	9,55	0,50
Mulher	1,031	88,12	1,90	4,50	5,30	11,88	0,18
Vaca	1,030	87,25	3,50	3,80	4,80	12,75	0,65

Deficiências nutricionais, estágio de lactação, mastites e outras enfermidades podem alterar a composição leite produzido. A Tabela 2, retrata essas alterações no leite bovino.

Tabela . 2. Teores de constituintes no leite normal e no leite infectado de vaca.

Componentes do Leite	% no Leite Normal	% no Leite Infectado
Gordura	3,5	3,2
Lactose	4,8	4,4
Caseína	2,8	2,3
Na ⁺	0,057	0,015
Cl ⁻	0,091	0,147
Ca ²⁺	0,12	0,04
K ⁺	0,173	0,157

Conseqüentemente a análise química quantitativa do leite é fator indispensável para o estabelecimento da sua qualidade nutricional e adequação para o consumo humano. Considerando os constituintes inorgânicos, pode-se estabelecer a qualidade nutricional do leite, determinando alguns elementos presentes como o Ca (29,4 mmol.L⁻¹), K (34,7 mmol.L⁻¹), Mg (5,1 mmol.L⁻¹), Na (24,2 mmol.L⁻¹), P (11,2 mmol.L⁻¹), Ba, Cu, Fe, Mn e Zn que variam de 0,15µg.mL⁻¹ a 0,02 µg.mL⁻¹ (JENSEN, 1995; SANTOS, 2002).

Os minerais no leite não estão totalmente presentes somente na fase aquosa, podendo ser encontrados na dispersão coloidal ou associados às proteínas. Sabe-se, no entanto, que íons de Ca, Mg, fosfatos e citratos podem interagir com as micelas de caseína. Os chamados elementos traço, encontrados em quantidade muito reduzida, na maioria dos alimentos, estão ligados às proteínas e lipídeos.

3. 6. 1. 2. Propriedades físico-química do leite: (GUIMARÃES, 2003).

Sabor e Odor

Sabores e odores pronunciados em leite fresco deve-se usualmente à alimentação (ração e silagem) e ao ambiente de ordenha. O leite fresco produzido em condições ideais, apresenta sabor *sui generis* pouco pronunciado em decorrência da relação entre lactose e cloretos, apresentando-se como doce e salgado, não ácido e não amargo, podendo ser afetado pela ocorrência de mamite (infecção do úbere).

Cor

A cor branca é resultante da dispersão da luz refletida pelos glóbulos de gordura e pelas partículas coloidais de caseína e de fosfato de cálcio. A cor amarela é proveniente do pigmento caroteno, que é lipossolúvel. Cores anormais são resultantes do desenvolvimento microbiano, como a cor vermelha causa pela bactéria *Serratia marcescens* e a cor azul, pela bactéria do gênero *Pseudomonas*.

Acidez

O leite logo após a ordenha, apresenta reação ácida com a fenolftaleína, mesmo que não tenha ocorrido a produção do ácido láctico por fermentação. A acidez do leite fresco deve-se à presença de caseína, fosfatos, albuminas, dióxido de carbono e citratos, e varia entre 0,13 e 0,17%, expressa em ácido láctico. A elevação da acidez é consequência da transformação da lactose em ácido láctico por enzimas oriundas de microorganismos bacterianos.

pH

Para o leite proveniente de diversas fontes, após misturado, o pH varia entre 6,6 e 6,8 com média de 6,7 a 20°C ou 6,6 a 25°C.

Densidade

Variável entre 1,023 g.mL⁻¹ e 1,040 g.mL⁻¹ a 15°C, com valor médio igual a 1,032 g.mL⁻¹. No entanto, leite com alto teor de gordura apresenta maior densidade quando

comparado a um leite com baixo teor de gordura, em razão do aumento do extrato seco desengordurado que acompanha o aumento do teor de gordura.

3. 6. 1. 3. – Produção de leite no Brasil

A Instrução Normativa nº 51, de 18/09/2002 (MAPA, 2002) classifica o leite em função dos padrões bacterianos:

Leite A: limite bacteriano na contagem padrão de $1,0 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹ e inexistência de coliformes fecais. É obtido por ordenha mecanizada, podendo ser processado no mesmo local, quando resfriado abaixo de 4°C.

Leite B: limite padrão bacteriano de $5,0 \times 10^5$ UFC . mL⁻¹, coliformes totais de 4,0 célula.mL⁻¹ e coliformes fecais de 1,0 célula.mL⁻¹. É obtido preferencialmente por ordenha mecanizada, transportado, resfriado abaixo de 4°C, processamento ou pasteurização na usina.

Leite C: limite bacteriano de $3,0 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹, coliformes totais de 4,0 células.mL⁻¹ e coliformes fecais de 2,0 células.mL⁻¹. A obtenção é por ordenha manual e industrialização no menor prazo possível visando diminuir contaminação.

Ainda é aceita a presença de microorganismos e coliformes fecais nos leites tipo B e C, incluído na alimentação do país. A classificação do leite, quanto aos padrões bacterianos, de acordo com nutricionistas é inaceitável e não poderia ser viabilizada para o consumo, sabendo-se do perigo que os padrões inferiores provocariam na saúde (COSTA, 1999).

Constantemente observamos diversas publicações em jornais e revistas especializadas, artigos que retratam a qualidade do leite consumido no Brasil. A maioria dos artigos publicados enfoca a produção do leite do tipo C.

O leite tipo C e o clandestino envolvem problemas que se relacionam a rebanhos doentes, ordenha inadequada, transporte impróprio e refrigeração ineficiente do produto colocado à disposição do consumidor. Doenças como tuberculose, difteria, campilobacilose, listeriose e enterites podem ser potencialmente transmitidas ao homem através do leite e seus subprodutos (FARIA & MATTOS, 1999).

A composição do leite pode ser alterada pela deficiência nutricional do rebanho ou por medicamentos fornecidos à vaca como: antibióticos, carrapaticidas, bernicidas, vermífugos e outros pesticidas, sem considerar a não observação do estágio de lactação. Os fatores mencionados acima têm como consequência a baixa produtividade leiteira. Produtos clandestinos vendidos em bares, feiras e ruas, sem fiscalização, representam ainda 40% do total da produção nacional, não seguem normas de higiene e não são inspecionados.

Recursos deveriam ser investidos para melhoria da nutrição do gado bovino, controle de vacinação e criação de condições que visam tornar o manejo da ordenha adequados, com o mínimo de higienização para impedir a contaminação. Não se pode deixar de observar os recursos para transporte e recipientes limpos, além do resfriamento imediato para atingir os objetivos especificados, que é a produção e comercialização de um produto sem contaminação bacteriana, não contendo antibióticos e outras substâncias que alterem seu odor e sabor.

A produção de um leite ideal se deve mais à concepção correta dessa produção, do que simplesmente da relação com uma infra-estrutura que considere apenas roupas especiais, paredes azulejadas, equipamentos para ordenha, visto que, a ordenha mecânica não garante, por si só, a produção de leite de qualidade. A limpeza, a manutenção dos equipamentos e a forma de ordenhar podem afetar a qualidade do produto. Somente um tipo de leite deveria ser comercializado: o saudável e nutritivo. Assim considerando o leite como o mais completo recurso alimentar, torna-se necessário o aperfeiçoamento e modernização da legislação para a produção do mesmo (FARIA & MATTOS, 1999).

De acordo com a Instrução Normativa nº 51, de 18/09/2002, (MAPA, 2002) nas Regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, até 01/07/2005, e nas Regiões Norte e Nordeste até 01/07/2007, o leite tipo C será extinto e passará a ser produzido um leite pasteurizado, com coleta a granel e refrigeração logo após a ordenha. Infelizmente, as condições econômicas do povo brasileiro e a falta de conscientização de todos os envolvidos na produção leiteira, se tornam empecilhos para a melhoria do leite consumido. Beneficiar o produtor e tornar o produto adequado para concorrer com produtos importados, não deixam de ser objetivos essenciais para conseguir a produtividade com a qualidade desejada. Investir é obrigação das entidades governamentais, mas conscientizar é ainda

mais importante. Só através de uma educação voltada para esses parâmetros, seria possível produzir um leite de boa qualidade.

3. 7. – Os Minerais Estudados

Os elementos minerais, principalmente os íons metálicos, presentes no organismo animal podem ser classificados como elementos principais (macronutrientes) e elementos traço (mg.L^{-1}). Alguns desses íons metálicos são indispensáveis aos organismos vivos, contudo, quando presentes em excesso podem produzir efeitos danosos, e outros mesmo em baixas concentrações, são extremamente tóxicos, como por exemplo: Pb, Cd, As e Hg. O equilíbrio ou balanço dos íons nos tecidos vivos, é freqüentemente de grande importância fisiológica, havendo um balanço delicado entre os elementos traço e os elementos minerais principais (HARPER et al., 1982).

Dos mais de 37 elementos minerais encontrados no organismo humano, existem doze que são classificados como essenciais: cálcio, magnésio, sódio, potássio, fósforo, enxofre, cloro, ferro, cobre, cobalto, zinco e manganês. Estes elementos constituem 60 – 80% de todo material inorgânico no organismo humano. Os elementos traço podem ser subdivididos em três grupos: essenciais, possivelmente essenciais e não essenciais, de acordo com as necessidades dietéticas dos organismos animais superiores (KAIM & SCHWEDERSKI, 1994).

3. 7. 1. – Cálcio e Magnésio

O cálcio constitui aproximadamente 5% da crosta terrestre na forma de rochas sedimentares de origem biológica datando de cerca de três bilhões de anos. Na água marinha, a concentração total de cálcio é cerca de 5 a 50 vezes maior do que em água doce. Água doce com concentração de cálcio superior a $1,5 \text{ mmol.L}^{-1}$, é classificada como “água dura”, sendo que sua concentração nesse tipo de água varia em função de sua localização e profundidade (McCARROLL, 1993; GREWOOD & EARSHWAW, 1997). Embora compostos de cálcio sejam considerados relativamente inofensivos para todos os organismos, e sendo o elemento considerado um metal não industrialmente perigoso, tem sido reconhecido que compostos de cálcio podem ser perigosos na forma de poeiras, devido aos seus efeitos mecânicos sobre a integridade de tecidos pulmonares (SEILER et al., 1988).

O magnésio é o oitavo elemento mais abundante na crosta terrestre e é de importância fundamental e absoluta para todos os seres vivos, sendo o principal metal encontrado na clorofila. O magnésio é encontrado nos minerais dolomita, magnesita, carnalita e em uma variedade de águas naturais, incluindo água marinha (McCARROL, 1993; GREEWOOD & EARSHAW, 1997). Existe uma diversificação em relação ao teor de magnésio nos alimentos, como por exemplo, os derivados de cacau, várias nozes, o feijão, soja e alguns alimentos do mar são ricos em magnésio (de 100 a 400 mg/100g). Os grãos integrais, as ervilhas e feijões crus e secos contêm de 100 a 200 mg de Magnésio/100g. O leite humano contém aproximadamente 4,0 mg de Magnésio.dL⁻¹; o leite de vaca contém cerca de 12,0 mg.dL⁻¹ (HARPER, 1982).

3. 7. 2. Cálcio e magnésio no organismo humano

Cerca de 99% do cálcio no organismo está no esqueleto onde ele corresponde aos depósitos de fosfatos de cálcio impregnados em uma matriz fibrosa e mole. A pequena quantidade restante de cálcio no corpo humano está nos fluidos do organismo, onde se encontra ionizado. Essa pequena quantidade ionizada nos fluidos é de grande importância na coagulação sanguínea, na manutenção da excitabilidade normal do coração, músculos e nervos pela hidrólise do ATP, nos aspectos diferenciais da permeabilidade de membrana e é também um cofator na ação catalítica de várias enzimas (HARPER et al. 1982).

A Tabela 3 mostra a distribuição de cálcio nos líquidos e tecidos corporais (HARPER et al. 1982).

Tabela. 3. Distribuição do cálcio nos líquidos e tecidos corporais.

Líquido ou Tecido	Mg.dL ⁻¹ ou 100 g
Soro	9,0 – 11,0
L.C.R	4,5 – 5,0
Músculo	70,0
Nervo	15,0

A quantidade dietética recomendada de cálcio e magnésio é apresentada na Tabela 4.

Tabela. 4. Quantidade dietética recomendada de Cálcio e Magnésio*.

	Idade (anos)	Peso (Kg) (lbs)		Altura (cm) (in)		Energia (Kcal) ²	Ca ²⁺ (mg)	Mg ²⁺ (mg)
Lactentes	0,0 – 0,5	6	14	60	24	Kg x 117	360	60
	0,5 – 1,0	9	20	71	28	Kg x 108	540	70
Crianças	1,0 – 3,0	13	28	86	34	1300	800	150
	4,0 – 6,0	20	44	110	44	1800	800	200
	7,0 – 10	30	66	135	54	2400	800	250
Homens	11 – 14	44	97	158	63	2800	1200	350
	15 – 18	61	134	172	69	3000	1200	400
	19 – 22	67	147	172	69	3000	800	350
	23 – 50	70	154	172	69	2700	800	350
Mulheres	51 +	70	154	172	69	2400	800	350
	11 – 14	44	97	155	62	2400	1200	300
	15 – 18	54	119	162	65	2100	1200	300
	19 – 22	58	128	162	65	2100	800	300
	23 – 50	58	128	162	65	2000	800	300
	51 +	58	128	162	65	1800	800	300
Gestantes						+300	1200	20
						+500	1200	25
Lactentes								

* Recommended Dietary Allowances, 8^a ed. rev. Food and Nutrition Board, National Research Council National Academy of Sciences, 2001.

O cálcio é absorvido por um processo de transporte ativo que ocorre principalmente na parte superior do intestino delgado, sendo que esse processo é regulado pelo 1,25 diidroxicolecalciferol (metabólito da vitamina D), que é produzido no rim em resposta à concentrações baixas de Ca. Sua inibição pode ocorrer por diversos fatores dietéticos que ocasionam formações de sais insolúveis de cálcio no intestino (SEILER et al., 1998). O controle do metabolismo do cálcio é realizado pelos hormônios paratireoideano e calcitonina.

Alterações nas concentrações de cálcio podem provocar: raquitismo, acidoses, osteoporose, hiperparatireoidismo, cálculo renal e Síndrome de Cushing. Uma diminuição de íons de cálcio no soro resulta em tetania muscular, enquanto um aumento pode provocar deficiência respiratória.

O magnésio é o segundo cátion mais abundante nos tecidos moles e nos líquidos corporais. No corpo humano, os ossos são os locais de maior armazenamento de magnésio, cerca de 65% do total, seguido pelo fluido celular com 34% e 1% de magnésio pode ser encontrado no fluido intestinal. No soro, cerca de 33% do magnésio total está ligado as proteínas, 53% encontra-se na forma de íons livres e o restante formam complexos com fosfato e citrato. Dentre as diversas funções do magnésio no organismo humano, podemos citar a sua participação em mais de 300 processos enzimáticos agindo como cofator, ativação do ATP/ADP, síntese intracelular dos ácidos nucleicos, transmissão neuromuscular. A sua forma iônica é um neutrópico com ação tranqüilizante sobre a excitabilidade do músculo liso e estriado, sendo indispensável para o funcionamento dos rins e do sistema imunológico. O metabolismo do magnésio é semelhante ao do cálcio e do fósforo com absorção e excreção intestinal. A deficiência de magnésio no homem induz disfunção neuromuscular, manifestada por hiperexcitabilidade com tremor e convulsões, sendo algumas vezes acompanhada por distúrbios de comportamento. A ocorrência generalizada de magnésio nos alimentos torna a possibilidade de uma deficiência, nas condições normais, extremamente rara. As estimativas quanto às necessidades de magnésio para os adultos masculinos, variam de 200 mg.dL^{-1} até a 700 mg.dL^{-1} . O leite humano contém $4,0 \text{ mg.dL}^{-1}$; o leite de vaca cerca de $12,0 \text{ mg.dL}^{-1}$ (HARPER et al. 1982).

3. 7. 3. Determinação de cálcio e magnésio em amostras biológicas

Os métodos clássicos para a determinação do cálcio envolvem a precipitação do mesmo a oxalatos, seguida pela dissolução deste precipitado em ácido sulfúrico e titulação com solução de permanganato (HULANICKI et al. 1990). No caso do magnésio, o método padrão para sua determinação envolve a separação do magnésio por precipitação como fosfato de amônio e magnésio. A desvantagem desse método é que além de consumir bastante tempo, produz resultados inexatos, dificultando sua aplicação em análise de rotina.

Em 1960 com o surgimento dos espectrômetros de absorção atômica, houve um grande interesse na possibilidade de seu uso para determinação de íons metálicos tais como Na, K, Ca e Mg. (WILLIS, 1999). A determinação da concentração total (forma iônica e fixa) do cálcio é de grande importância nos diagnósticos médicos.

Através de potenciometria com eletrodos íon seletivo, tornou-se possível a determinação de cálcio ionizado em análises clínicas (HULANICKI et al. 1990). A determinação do cálcio total em soro através da acidificação da amostra a um pH onde os complexos de cálcio apresentam-se totalmente dissociados, foi descrito por Anker et al. (1981).

Manzoni et al. (1985) descreveram um procedimento para determinação de cálcio, fundamentado na descomplexação do cálcio por diluição e adição de $0,4 \text{ mmol.L}^{-1}$ de íons de zinco com objetivo de deslocar o restante de cálcio ligado a outros complexos e a proteínas.

Para a determinação direta de magnésio são empregados métodos ponteciométricos utilizando eletrodos íon seletivo (ISE) e fluorescência molecular. A determinação rápida de cálcio e magnésio em leite por espectrofotometria de absorção atômica, após a digestão no forno de microondas foi realizada por De La Fuente & Juarez (1995a).

Utilizando ICP-MS, Torres et al. (2000) estudaram procedimentos para a determinação rápida de magnésio em leite e produtos lácteos. Apesar do respectivo procedimento apresentar um custo elevado devido a técnica empregada (ICP-MS), é um método rápido para a determinação de magnésio, quando comparados com outras técnicas de determinação de magnésio em leite e outros alimentos para o controle de qualidade e em estudos nutricionais.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4. 1. Instrumentos e acessórios

No desenvolvimento deste trabalho foram utilizados os seguintes instrumentos e materiais:

- . Espectrômetro de Absorção Atômica por Chama (FAAS), VARIAN, modelo Spectra AA-220 (Vitória – Austrália), utilizando nebulizador com “Efeito Venture” e detector fotomultiplicador.

- . Lâmpada de cátodo oco de cálcio, magnésio, Varian. ($\lambda = 422,6$ nm para cálcio e $\lambda = 285,3$ nm para magnésio).

- . Forno de microondas com cavidade- PROVECTO (Campinas- S.P.) Modelo DGT-100, com frascos fechados de Teflon (PTFE) medindo cerca de 12 cm de comprimento por 4,0 cm de largura com espessura de 3,0 mm.

- . Termômetro INCOTERM – variação de temperatura de 0 a 50°C

- . Balança Analítica – OHAUS - Modelo AS-200 – Serial nº 4567.

- . Desionizador de água QUIMIS - Modelo Q – 180. M22.

- . Destilador de Água M.A – 078 – Marconi.

- . Os frascos e vidraria utilizadas no presente trabalho foram descontaminados em solução de ácido nítrico (HNO_3) 10 % v.v⁻¹ durante 24 horas e, posteriormente, lavados com água desionizada.

4. 1. 1. Reagentes e soluções

- . Ácido nítrico – densidade 1,40 g.mL⁻¹, 65% (m.v⁻¹) – Nuclear.

- . Peróxido de hidrogênio – H_2O_2 – 20% (m.v⁻¹) - Vetec.

- . Óxido de lantânio (La_2O_3) – Vetec.

- . Solução de referência de 1000 mg.L⁻¹ Ca e Mg - Carlo Erba.

. Ácido cítrico anidro P.A. Isofar.

. Monoetanolamina – (MEA) - P.A. Grau de pureza 98% Vetec.

. Trishidroximetilaminometano – (TRIS) – Grau de pureza 99,98% - Vetec

. Ácido clorídrico concentrado – HCl – densidade $1,19 \text{ g.mL}^{-1}$, 36% m.v⁻¹

Vetec.

. Todas as soluções foram preparadas utilizando-se água desionizada (resistividade = $18,0 \text{ M}\Omega\text{cm}$) e acondicionadas em frascos de polietileno. As soluções empregadas neste trabalho encontram-se relacionadas a seguir:

. Soluções de referência de cálcio e magnésio foram preparadas por diluição apropriada de soluções estoque contendo 1000 mg.L^{-1} (Carlo Erba). Foram utilizadas soluções de concentrações 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$ para cálcio e de 0,2; 0,4; 0,8 e $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ para magnésio para o preparo da curva analítica. Todas essas soluções foram preparadas em ácido nítrico e cloreto de lantânio, cujas concentrações finais eram de 10 % v. v⁻¹ e 10 % m.v⁻¹ (de La), respectivamente. A solução de HNO_3 10 % v.v⁻¹ e La 10% m.v⁻¹ também foi utilizada como branco analítico.

. Solução de cloreto de lantânio (10% v.v⁻¹) foi preparada pela dissolução de 29,33 g de óxido de lantânio em 75,0 mL de ácido clorídrico concentrado e completando o volume para 250,0 mL com água desionizada.

. Soluções de aminas com ácido cítrico foram realizadas da seguinte maneira:

a – solução de monoetanolamina (MEA) + ácido cítrico ($6,0 \text{ mol.L}^{-1}$ + $0,20 \text{ mol.L}^{-1}$). Misturou-se 1,92 g de ácido cítrico anidro dissolvido em água à 18,3 mL de monoetanolamina (MEA) e a seguir completou-se o volume da mistura para 50 mL com água desionizada.

b – solução de Trishidroximetilaminometano (TRIS) + ácido cítrico ($1,5 \text{ mol.L}^{-1}$ + $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$). Misturou-se 0,48 g de ácido cítrico a 9,0 g de trishidroximetilaminometano. O volume foi completado em um balão volumétrico para 50,0 mL com água desionizada.

Essa solução foi preparada em uma concentração quatro vezes menor que a solução de MEA devido à solubilidade da respectiva amina em ácido cítrico. Com a adição do ácido, ocorreu a dissolução da amina, formando uma solução límpida.

4.2. METODOLOGIA

4.2.1. Calibração do forno de microondas e distribuição das microondas no interior do forno

Antes de iniciar os experimentos de digestão das amostras de leite em forno de microondas, fez-se a calibração do forno, com o objetivo de relacionar a potência disponível.

A calibração foi efetuada de modo semelhante ao recomendado pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA, Environmental Protection Agency) (KINGSTON & JASSIE, 1988). A calibração do forno de microondas foi efetuada através da medida da variação de temperatura de 1,0 kg de água exposta à radiação do forno microondas por certo período de tempo. O forno de microondas utilizado neste trabalho permite a colocação de doze frascos de Hostaflon e, possui níveis de potência variáveis de 0 a 999 watts. A calibração foi realizada aquecendo 1,0 kg de água num tempo de 2,0 min, com intervalo de potência de 100 em 100 watts, onde medimos a temperatura inicial (T_i) e a temperatura final (T_f). Os experimentos foram realizados em duplicata. O cálculo da potência disponível no forno de microondas foi efetuado pela equação 1.

$$W = \frac{K \cdot cp \cdot m \cdot \Delta T}{t} \quad (1)$$

onde:

K = fator de conversão de calorias.s⁻¹ para Watts = 4,184 W.cal⁻¹ s

cp = calor específico da água (1,00 cal.g⁻¹.°C)

m = massa de água utilizada

ΔT = variação da temperatura

t = tempo de aquecimento

Em nosso experimento para $m = 1,0$ kg e $t = 120$ s, a equação 1 pode ser simplificada para a equação 2:

$$W = 34,87 \cdot \Delta T \quad (2)$$

Fez-se uma investigação experimental da distribuição das microondas dentro da cavidade do forno. Para esse experimento foram utilizados frascos de PTFE (politetrafluoretileno) com capacidade de 150 mL, sendo que em cada um foram colocados 50,0 mL de água. O prato giratório foi retirado do forno e os frascos, previamente pesados, foram distribuídos em 27 posições no interior do forno, sendo que o aquecimento de cada frasco foi efetuado individualmente. Na figura 2 está apresentada a disposição dos frascos no interior do forno de microondas juntamente com as três alturas investigadas. Um suporte de plástico, medindo 40 x 40cm foi utilizado como suporte quando fez-se o estudo das microondas nas alturas de 6,5 cm e 13,0 cm acima da superfície do forno. Para a sustentação do respectivo suporte foram utilizados frascos plásticos de 100 e 1000 mL para as respectivas alturas de 6,5 cm e 13,0 cm. As figuras 2 e 3 mostram o posicionamento dos frascos de PTFE no interior do forno de microondas.

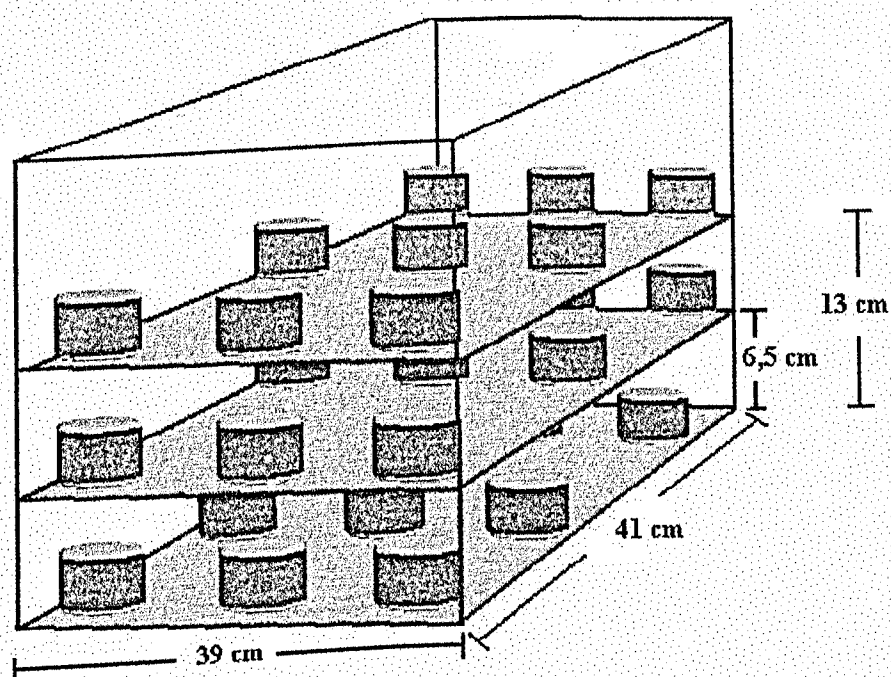


Figura 2. Posicionamento dos frascos de polietileno de acordo com as alturas investigadas.

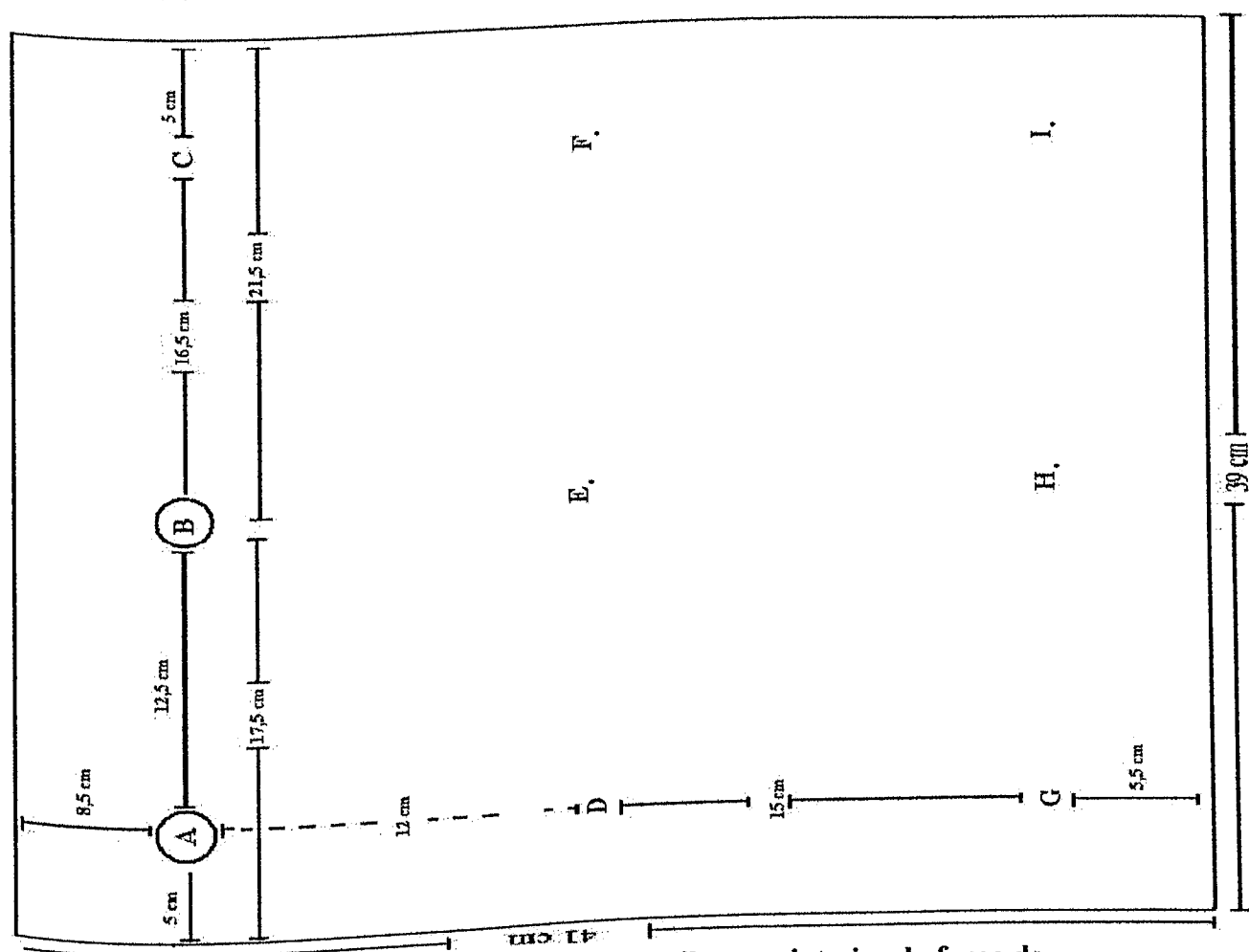


Figura 3. Posicionamento dos frascos de polietileno no interior do forno de microondas

4. 2. 2. Digestão das amostras de leite em forno de microondas

A eficiência da digestão de amostras em forno de microondas depende de fatores como: a natureza da amostra, a potência do forno empregada, o tempo de atuação das microondas, a quantidade de amostra, os reagentes utilizados e a temperatura e pressão das microondas, a quantidade de amostra, os reagentes utilizados e a temperatura e pressão das microondas, a quantidade de amostra, os reagentes utilizados e a temperatura e pressão das microondas (BARBOZA et al. 2001). Com o intuito de determinar a digestão adequada, vários procedimentos variando o volume das amostras e o tempo de digestão foram investigados e em todas as digestões utilizou-se 2,0 mL de HNO_3 concentrado e 1,0 mL de H_2O_2 . Foram utilizadas essas quantidades por serem recomendadas no manual de instruções do fabricante do forno. Nas investigações relacionadas ao efeito do volume da amostra, o volume utilizado variou de 0,5 a 2,5 mL, com incrementos de 0,5 mL e, com relação ao tempo, a

variação foi de 1,0 a 5,0 min. Todos esses experimentos foram realizados em triplicata e sempre havia um "branco" para cada uma das condições estudadas. Nas investigações para a determinação do Mg, os digeridos foram diluídos para 100,0 mL com água desionizada e adicionou-se 2,5 mL cloreto de lantânio 10% (m.v⁻¹), para eliminação dos interferentes.

Para a determinação do Ca nas amostras de 0,5 a 1,5 mL de leite, os digeridos foram diluídos para 100,0 mL com água desionizada adicionando-se 2,5 mL de cloreto de lantânio 10% (m.v⁻¹). Para as amostras de 2,0 e 2,5 mL de leite utilizadas na determinação de Ca foram necessárias novas diluições, as quais foram executadas retirando-se alíquotas de 5,0 mL das amostras diluídas, colocando-as em um balão volumétrico de 100,0 mL e completando o volume com água desionizada.

Após as respectivas diluições, tanto para o Mg quanto para o Ca, os digeridos foram armazenados em frascos plásticos de capacidade volumétrica de 150 mL.

Com relação ao efeito do tempo na digestão das amostras no forno de microondas, foram investigados diversos programas de aquecimento, os quais foram indicados por P₁, P₂, P₃, P₄ e P₅ e estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Programas de aquecimento para digestão de amostras de leite em forno de microondas PROVECTO DGT- 100.

Programa	Etapas							
	1		2		3		4	
	Tempo/ min	Potência/ W	Tempo/ min	Potência/ W	Tempo/ min	Potência/ W	Tempo/ min	Potência/ W
P ₁	1	250	1	0	1	450	1	650
P ₂	2	250	2	0	2	450	2	650
P ₃	3	250	3	0	3	450	3	650
P ₄	4	250	4	0	4	450	4	650
P ₅	5	250	5	0	5	450	5	650

Após a execução dos respectivos programas de aquecimento, os frascos de digestão contendo as amostras foram resfriadas por imersão parcial em água à temperatura.

4. 2. 3. Digestão das amostras de leite pelo método convencional

O procedimento de digestão convencional foi realizado de acordo com as normas analíticas estabelecidas pelo Instituto Adolfo Lutz (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1998). Para tal determinação foram utilizados 20,0 mL de amostra de leite que teve o volume reduzido até quase a secura em banho-maria, num intervalo de tempo de 12 horas. Em seguida, esse material foi calcinado em mufla por uma rampa de aquecimento de 100 em 100°C até chegar a 500°C, sendo mantido nessa temperatura por 1 h. O respectivo material foi resfriado até a temperatura ambiente em dessecador. As cinzas foram dissolvidas em ácido clorídrico concentrado, tendo o seu volume completado para 250,0 mL em balão volumétrico com água desionizada. Dessa solução foram retiradas alíquotas de 1,0 mL para a determinação do cálcio e 2,0 mL para o magnésio. Em todos recipientes adicionaram-se 2,5 mL de ácido nítrico ($1,0 \text{ mol.L}^{-1}$) e 2,5 mL de cloreto de lantânio 10% (m.v^{-1}) e completado o volume para 25,0 mL em um balão volumétrico. O mesmo procedimento foi efetuado para a solução do branco.

4. 2. 4. Preparo das amostras de leite com soluções de aminas

As amostras de leite (0,5 mL) foram diluídas com soluções de aminas e ácido cítrico. As aminas utilizadas foram monoetanolamina (MEA) e trishidroximetilaminometano (TRIS). Inicialmente, variou-se a concentração de MEA em 3,0; 6,0 e $12,0 \text{ mol.L}^{-1}$ e manteve constante a concentração molar do ácido cítrico. Posteriormente, manteve-se constante a concentração de MEA em $6,0 \text{ mol.L}^{-1}$, e variou a concentração molar do ácido cítrico. Utilizando a mistura TRIS + ácido cítrico, manteve-se constante a concentração do ácido cítrico e variou a concentração da TRIS em 0,5; 1,0

e $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$. Posteriormente, variou-se a concentração do ácido cítrico e manteve constante a concentração de TRIS em $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$. Em todas as investigações, o volume da amostra de leite foi de 0,5 mL e as suspensões de leite com a mistura contendo aminas foram diluídas para 50,0 mL. Os experimentos foram realizados em triplicata, existindo sempre um “branco” para cada uma das condições investigadas. Para as soluções contendo aminas não foi utilizada a solução de cloreto de lantânio a 10% (m.v⁻¹) no preparo final das amostras, pois, quando o mesmo foi acrescentado às soluções, houve a formação de grumos, o que impossibilitou a nebulização da amostra e conseqüentemente interferiu negativamente na leitura dos analitos no espectrômetro de absorção atômica por chama.

Na Tabela 6 estão apresentadas algumas características das aminas utilizadas no presente trabalho.

Tabela 6. Características físicas e químicas das aminas

Composto	Monoetanolamina (MEA)	Trishidroximetilaminometano (TRIS)
Características		
Fórmula molecular	$\text{H}_2\text{N} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 \text{OH}$	$(\text{HOCH}_2)_3 \text{C} - \text{NH}_2$
P.E. (°C)	166	220
pK _b	4,6	5,9
Aspecto físico	Líquido claro, transparente e higroscópico, com ligeiro odor amoniacal.	Sólido, branco
Custo (R\$)	Sequestrante de H_2S e CO_2 R\$28,00/1000mL	R\$300,00/kg

4.2.5. Condições instrumentais empregadas nas determinações de Ca e Mg

As determinações das concentrações de cálcio e magnésio presentes nas amostras foram realizadas utilizando-se espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS). A Tabela 7 retrata as condições utilizadas nas determinações de cálcio e magnésio por espectrometria de absorção atômica por chama.

Tabela 7. Condições instrumentais empregadas nas determinações de Ca e Mg

Parâmetros	Ca	Mg
Comprimento de onda (nm)	422,6	285,2
Largura da fenda (nm)	0,5	0,5
Corrente da lâmpada (mA)	10,0	4,0
Vazão do acetileno (L.min ⁻¹)	3,0	2,5
Vazão do ar (L.min ⁻¹)	10,0	10,0
Curva analítica (mg.L ⁻¹)	0 - 4,0	0 - 1,0

Para validação das metodologias foram realizados testes de recuperação para o cálcio e para o magnésio. O respectivo teste consta da adição de volumes respectivamente iguais a 0,5 e 1,0 mL de solução padrão de cálcio (0,5 e 1,0 mg) e de magnésio (0,05 e 0,10 mg) à amostra de leite e, posteriormente, determinou-se a concentração de cada um dos analitos nas amostras analisadas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5. 1. Forno de microondas para preparo das amostras

5.1.1. Calibração do forno de microondas e investigação da distribuição das microondas no interior do forno

O forno de microondas empregado nos experimentos permite a seleção de níveis distintos de potência. A Tabela 8 mostra a relação entre a potência real e a potência nominal descrita pelo fabricante. A massa de água utilizada foi de 1,0 kg e mediu-se a temperatura inicial (27° C) e a temperatura final, após a irradiação das microondas.

Tabela 8. Níveis de potência do forno de microondas utilizado.

Variação da temperatura/ °C			Potência nominal/W	Potência real/W	$\frac{P_{real}}{P_{nominal}} \times 100 \%$
t (início)	t (final)	Δt			
27	29,5	2,95	100	87,0	87,0
27	31,5	4,50	200	156,0	78,0
27	34,0	7,00	300	244,0	81,3
27	36,5	9,50	400	331,0	82,7
27	38,0	11,0	500	383,0	76,6
27	40,0	13,0	600	453,0	75,5
27	42,0	15,0	700	523,0	74,7
27	46,5	19,5	800	680,0	85,0
27	48,0	21,0	900	698,0	77,5

Na Figura 4 está apresentado o resultado obtido na calibração do forno de microondas com cavidade.

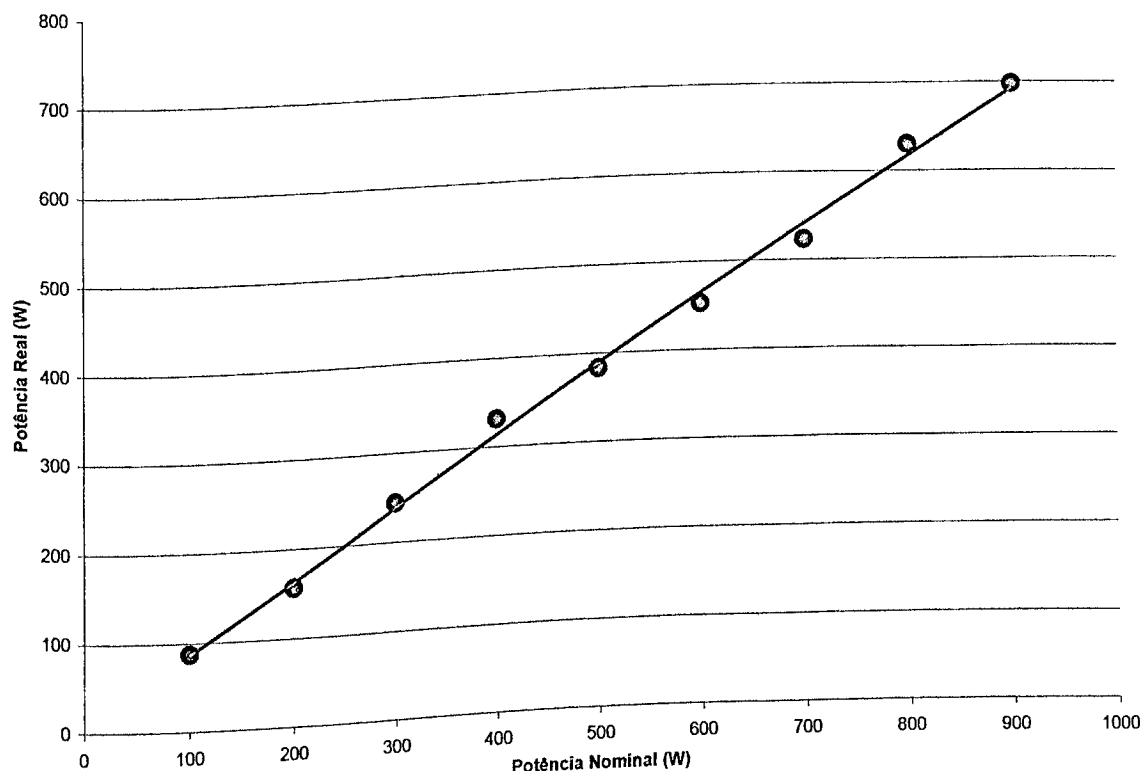


Figura 4. Curva de calibração obtida para o forno de microondas.

A análise da Tabela 8 e da Figura 4 permite concluir que o nível de potência real é, em média, % inferior a potência nominal. Conforme Kingston & Jassie (1988) essa diferença entre a potência nominal e a real pode ser devida à variação na corrente elétrica durante a calibração do forno e a perda de calor no próprio magnetron (KINGSTON & JASSIE, 1988).

O estudo da distribuição das microondas no interior do forno de microondas constitui-se num parâmetro de importância, pois torna possível o conhecimento da região de maior incidência das microondas.

As Figuras de 5 a 7 e as Tabelas de 9 a 11 indicam as respostas obtidas pela perda de massa de água em função das dimensões do forno (largura x comprimento) para os frascos de polietileno posicionados respectivamente na base, a 6,5 cm e 13,0 cm de altura, quando submetidas à potência máxima do forno de microondas (698 W) por um tempo de aquecimento de 1,0 minuto.

Nessas figuras, o eixo da largura representa o eixo onde está localizada a porta do forno de microondas. Nesse eixo, os valores 5,0 cm, 17,5 cm e 34,0 cm

correspondem aos frascos posicionados na parte esquerda, central e direita do interior do forno de microondas. No eixo representado pelo comprimento, os valores 8,5 cm; 20,5 cm e 35,5 cm correspondem aos frascos colocados respectivamente na frente, no centro e no fundo da cavidade do forno de microondas.

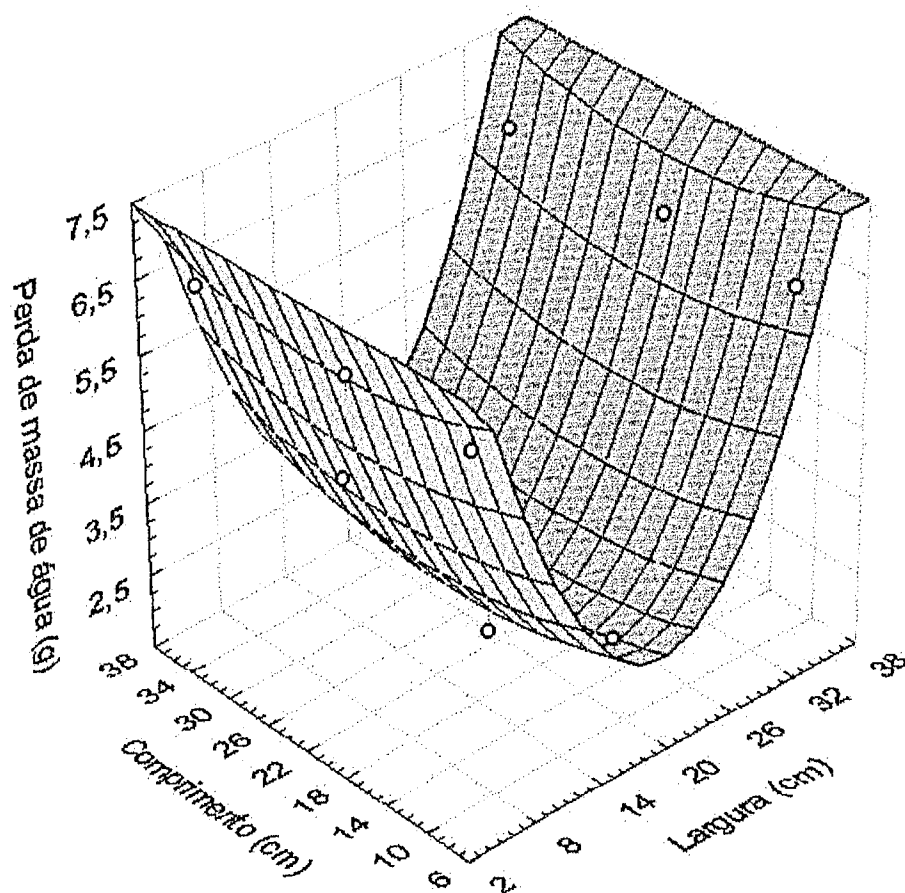


Figura 5 . Superfície de resposta obtida pela perda de água contida nos frascos de polietileno distribuídos na base do forno de microondas. Tempo de atuação das microondas de 1,0 minuto, potência máxima.

A Tabela 9 apresenta a variação da massa de água em gramas, em função das posições dos frascos de polietileno na plataforma do forno de microondas.

Tabela 9. Variação da massa de água em função das posições dos frascos de polietileno na plataforma do forno de microondas.

Posição dos frascos (largura / comprimento)	Massa de água		Variação da massa de água perdida
	massa (água inicial) / g	massa (água final) / g	
	49,82	43,41	6,41
A (5,0 / 8,5)	49,85	46,90	2,95
B (17,5 / 8,5)	49,86	43,44	6,42
C (34,0 / 8,5)	49,78	43,38	6,40
D (5,0 / 20,5)	49,76	47,81	1,95
E (17,5 / 20,5)	49,73	43,32	6,41
F (34,0 / 20,5)	49,81	43,41	6,40
G (5,0 / 35,5)	49,75	46,97	2,78
H (17,5 / 35,5)	49,56	43,14	6,42
I (34,0 / 35,5)			

Pela análise da Figura 5 e da Tabela 9 observou-se que as maiores perdas de água ocorreram quando os frascos de polietileno estão posicionados a 5,0 cm da lateral direita e a 5,0 cm da lateral esquerda em relação à largura do forno e a 8,5 cm; 20,5 cm e 35,5 cm de profundidade em relação à porta do forno, sendo essas perdas de água variáveis de 6,40 a 6,42g. Assim sendo, a perda de massa de água é maior ao longo das laterais do forno de microondas.

A Figura 6 apresenta as respostas obtidas pela perda da massa de água para os frascos de polietileno posicionados a 6,5 cm de altura da plataforma do forno, quando submetidos à potência máxima, por um tempo de aquecimento igual a 1,0 minuto.

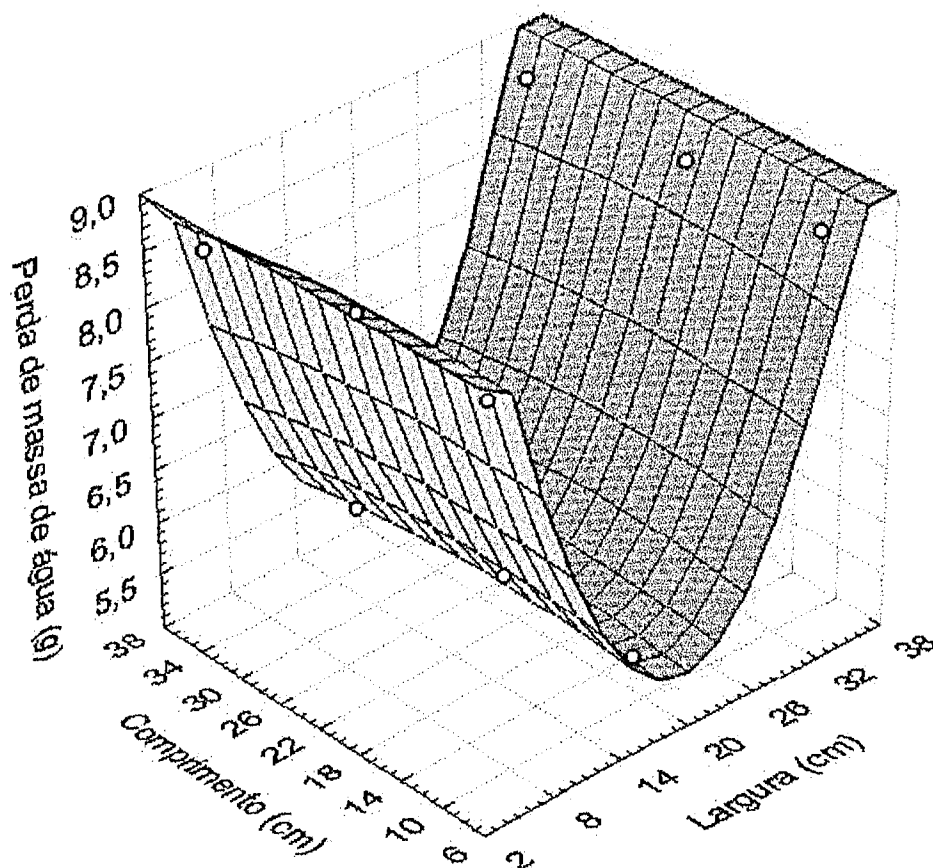


Figura 6. Superfície de resposta obtida pela perda da massa de água contida nos frascos de polietileno distribuídos a 6,5 cm de altura. Tempo de atuação das microondas de 1,0 minuto, potência de 698 W.

A Tabela 10 apresenta a variação das massas de água quando os frascos de polietileno foram colocados a 6,5 cm de altura da plataforma do forno de microondas.

Tabela 10. Variação da massa de água em função das posições dos frascos de polietileno à 6,5 cm de altura acima da plataforma do forno de microondas

Posição dos frascos (largura / comprimento)	Massa de água		Variação da massa de água perdida
	massa (água inicial) / g	massa (água final) / g	
A (5,0 / 8,5)	49,85	41,25	8,60
B (17,5 / 8,5)	49,90	44,27	5,63
C (34,0 / 8,5)	49,68	40,98	8,70
D (5,0 / 20,5)	49,84	41,12	8,72
E (17,5 / 20,5)	49,81	44,17	5,64
F (34,0 / 20,5)	49,58	40,90	8,68
G (5,0 / 35,5)	49,69	41,19	8,50
H (17,5 / 35,5)	49,84	44,42	5,42
I (34,0 / 35,5)	49,85	41,16	8,69

Pela análise da Figura 6 e da Tabela 10 que corresponde à perda de água contida nos frascos de polietileno distribuídos a 6,5 cm de altura da plataforma do forno, indicam que as maiores perdas de água, cujos valores variaram de 8,50 a 8,72 g corresponde à disposição a 5,0 cm da lateral direita e da lateral esquerda; e a 8,5 cm; 20,5 cm e 35,5 cm de profundidade em relação à porta do forno de microondas.

A Figura 7 apresenta a superfície de resposta obtida pela perda da massa de água para os frascos de polietileno posicionados a 13,0 cm de altura em relação à plataforma do forno, devido à atuação das microondas por 1,0 minuto à potência máxima.

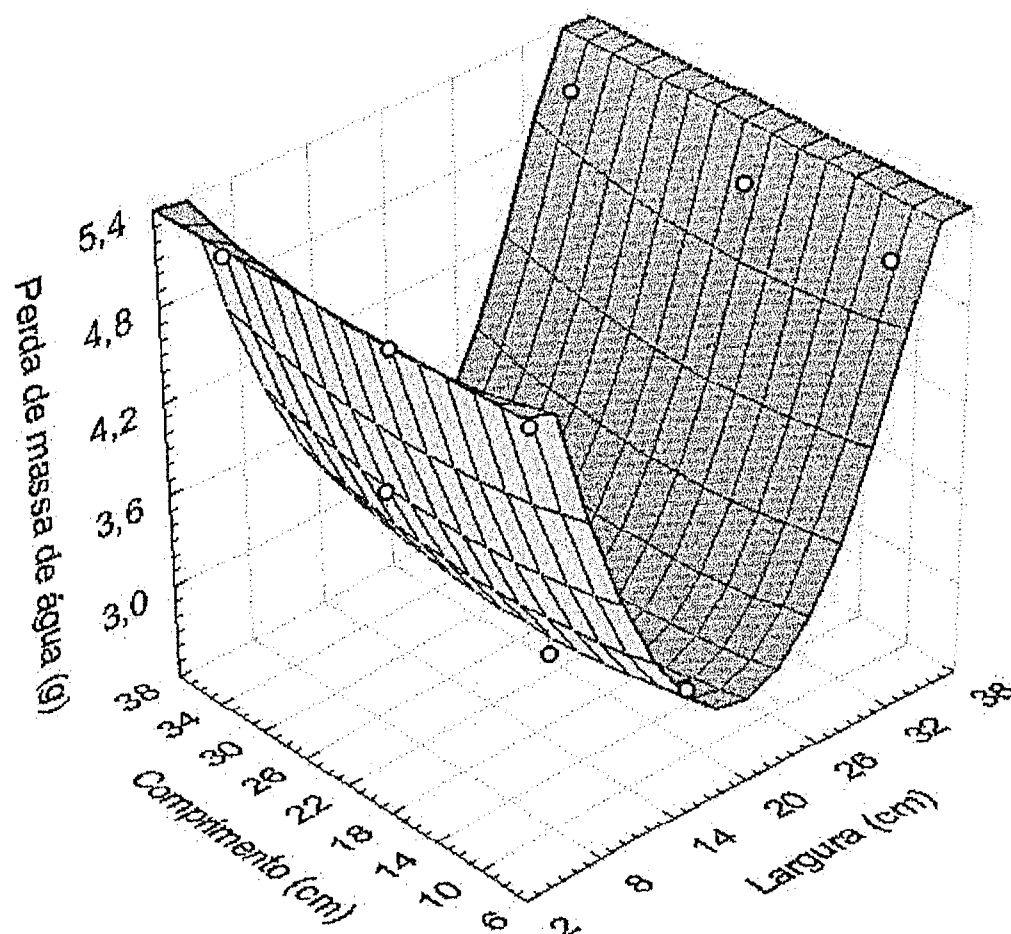


Figura 7. Superfície de resposta obtida pela perda da massa de água contida nos frascos de polietileno distribuídos a 13,0 cm de altura. Tempo de atuação das microondas de 1,0 minuto, potência de 698 W.

A Tabela 11 apresenta a variação da perda da massa de água, quando os frascos de polietileno foram dispostos a 13,0 cm de altura da plataforma do forno de microondas.

Tabela 11. Variação da massa de água em função das posições dos frascos de polietileno à 13,0 cm de altura acima da plataforma do forno de microondas.

Posição dos frascos (largura / comprimento)	Massa de massa (água inicial) / g	água massa (água final) / g	Variação da massa de água perdida
A (5,0 / 8,5)	49,90	44,78	5,12
B (17,5 / 8,5)	49,91	46,94	2,97
C (34,0 / 8,5)	49,90	44,80	5,10
D (5,0 / 20,5)	49,85	44,73	5,12
E (17,5 / 20,5)	49,88	47,23	2,65
F (34,0 / 20,5)	49,83	44,73	5,10
G (5,0 / 35,5)	49,86	44,75	5,11
H (17,5 / 35,5)	49,89	46,79	3,10
I (34,0 / 35,5)	49,86	44,74	5,12

Os resultados obtidos pela análise da Figura 7 e da Tabela 11, quando os frascos de polietileno estão posicionados a 13,0 cm de altura em relação à plataforma do forno de microondas, indicam que as maiores perdas de água ocorreram também a 5,0 cm da lateral esquerda e a 5,0 cm da lateral direita nas profundidades de 8,5 cm; 20,5 cm e 35,5 cm, cujos valores variaram de 5,10 a 5,13 g. Observa-se, no entanto, que quando comparamos o parâmetro altura dos frascos de polietileno em relação à plataforma do forno, as maiores perdas de água ocorreram a 6,5 cm, cujo valor corresponde à altura do prato giratório do forno em relação à sua plataforma.

5.1.2. Avaliação do efeito do volume das amostras de leite digeridas no

forno de microondas.

O efeito do volume das amostras de leite a serem analisadas foi estudado num intervalo de 0,5 a 2,5 mL com variação de 0,5 mL de leite. Nas amostras foram adicionadas 2,0 mL de HNO_3 ($14,0 \text{ mol.L}^{-1}$) e 1,0 mL de H_2O_2 30% (m.v⁻¹)

Para a digestão das amostras, a potência do forno de microondas utilizada variou-se de 0 W a 650 W com variação de 200 W, obedecendo a seguinte programação:

Dissertação de Mestrado

3,0 minutos a 250 W; 3,0 minutos a 0 W; 3,0 minutos a 450 W; 3,0 minutos a 650 W (Figuras 8 e 9). Observou-se que menores volumes da amostra possibilitam uma maior concentração da energia das microondas, o que notadamente determina uma digestão mais eficiente e, conseqüentemente uma melhor determinação de Ca e Mg. Tais condições experimentais estão de acordo também com as especificações contidas no manual de instrução do forno de microondas. Todos os experimentos foram executados em triplicata e os resultados apresentados são a média dos valores obtidos e as respectivas estimativas dos desvios padrão relativos. Para o volume de 0,5 mL de amostra de leite os desvios padrão relativos foram respectivamente de 0,3% e 0,7% para magnésio e cálcio, sendo estes considerados como os melhores resultados tanto para o Ca como para o Mg. Os resultados obtidos apresentaram um grau de confiança de 95% para todas as amostras estudadas.

O aumento do volume das amostras de leite de 1,5 a 2,5 mL provocou a formação de glóbulos de gordura, quando da digestão em forno de microondas impedindo a determinação de Ca e Mg no espectrômetro de absorção atômica por chama. Isso ocorreu porque com maiores volumes de amostra a eficiência da digestão através das microondas não é a mesma quando comparado às amostras de leite com volumes menores.

Para os volumes investigados de amostras do leite os valores do "branco" variam de 0,01 a 0,03 mg.L⁻¹ para o Mg e de 0,05 a 0,07 mg.L⁻¹ para o Ca.

As Figuras 8 e 9 apresentam, respectivamente, o efeito do volume de amostra na determinação do Ca e do Mg com os valores da média da concentração obtida e as estimativas dos desvios-padrão.

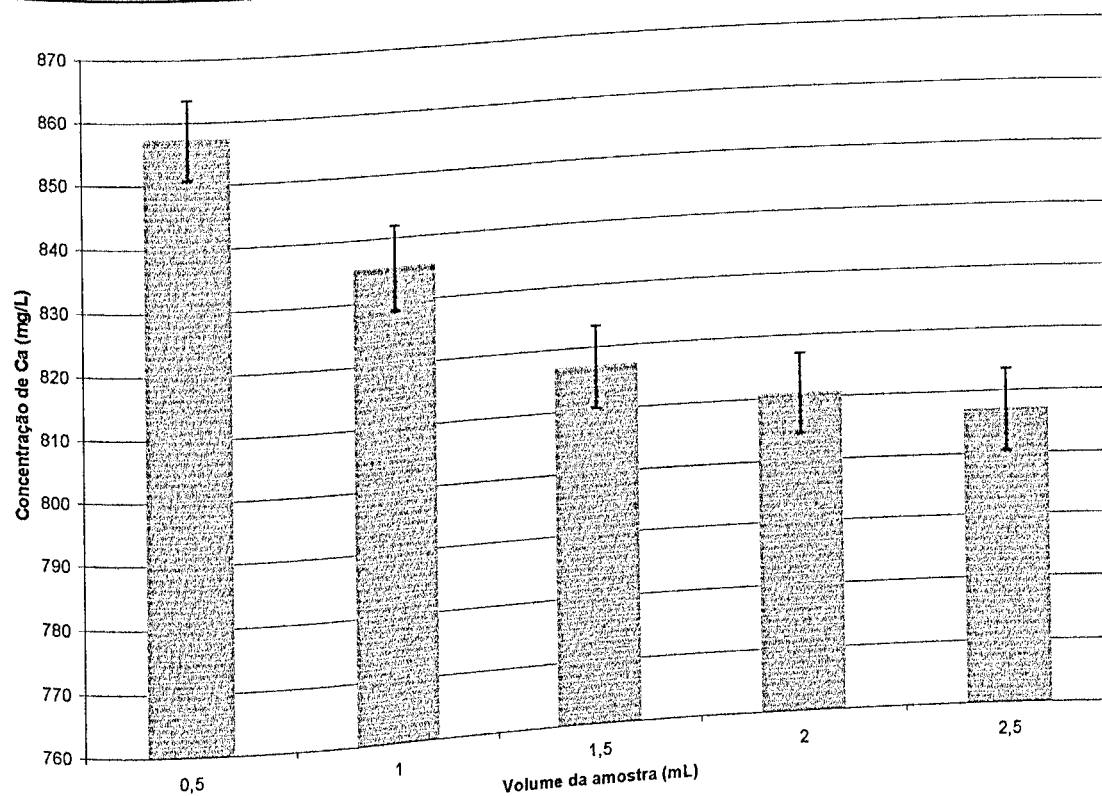


Figura 8. Efeito do volume de amostra utilizando forno de microondas no preparo das amostras e determinação do Ca.

Condições experimentais:

Volume da amostra de leite = 0,5; 1,0; 2,5; 2,0 e 2,5 mL

HNO_3 (14,0 mol.L⁻¹) = 2,0 mL

H_2O_2 (30% m.v⁻¹) = 1,0 mL

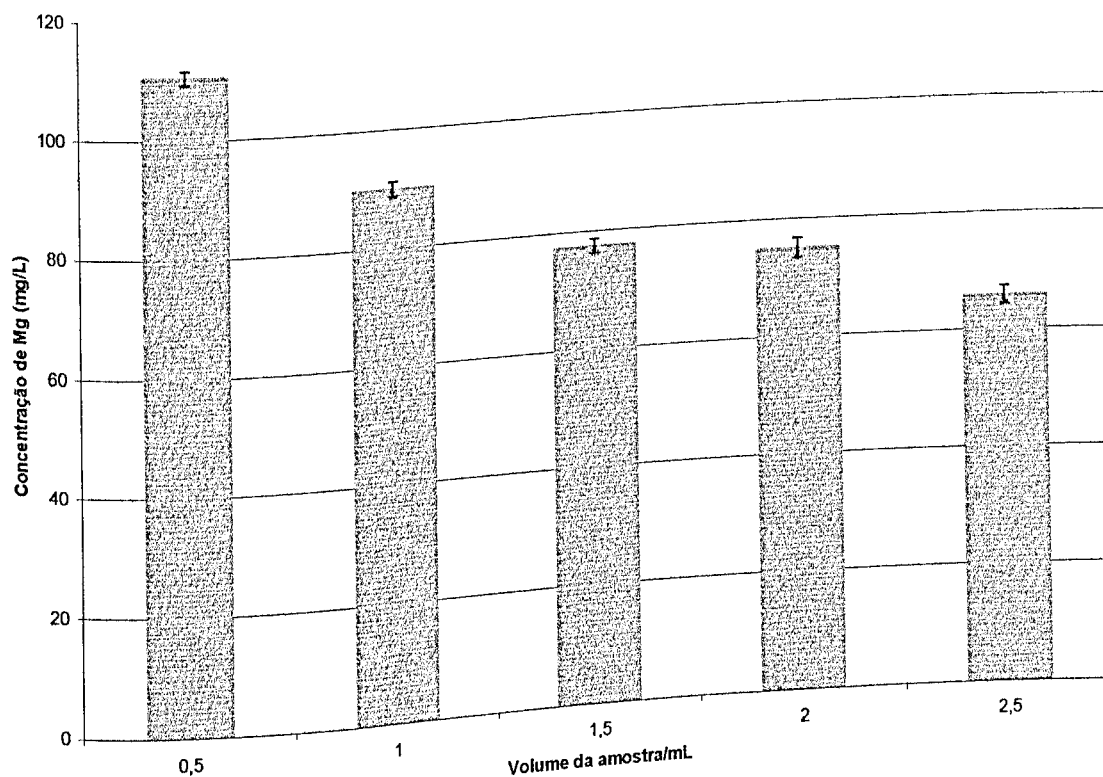


Figura 9. Efeito do volume de amostra utilizando o forno de microondas no preparo das amostras e determinação do Mg.

Condições experimentais:

Volume da amostra de leite = 0,5; 1,0; 2,5; 2,0 e 2,5 mL

Volume de HNO_3 ($14,0 \text{ mol.L}^{-1}$) = 2,0 mL

Volume de H_2O_2 (30% m.v⁻¹) = 1,0 mL

Comparando os resultados obtidos na determinação de Ca e Mg para amostras de leite de volumes 0,5 a 2,5 mL, verificou-se que a melhor determinação ocorreu quando utilizou 0,5 mL de leite, pois o respectivo digerido apresentou-se límpido sem glóbulos de gordura, facilitando a nebulização do mesmo e, conseqüentemente, a determinação dos analitos por espectrometria de absorção atômica por chama.

5.1.3. Avaliação do efeito tempo de digestão das amostras de leite digeridas no forno de microondas.

Todas as amostras de leite submetidas a variações do tempo de digestão no forno de microondas continham o volume constante de 0,5 mL e foram submetidas a uma mesma intensidade de potência (250 W, 0 W, 450 W, 650 W), ocorrendo variação apenas no tempo de atuação das microondas.

Os digeridos obtidos no programa de digestão I com tempo de duração igual a 4,0 minutos e programa de digestão II com tempo de duração de 8,0 minutos indicados respectivamente por P_1 e P_2 apresentaram uma coloração amarela, com glóbulos de gordura no fundo dos frascos de digestão. Para os programas indicados por P_4 (programa de digestão IV com tempo de duração igual 16 minutos) e P_5 (programa de digestão V com tempo de duração igual a 20 minutos) os digeridos apresentaram límpidos, sem glóbulos de gordura no fundo do frasco.

As Figuras 10 e 11 apresentam respectivamente o efeito do tempo de digestão da amostra em forno de microondas na determinação de Ca e Mg onde os resultados representam os valores médios de concentração (mg.L^{-1}) e a estimativa de desvio-padrão.

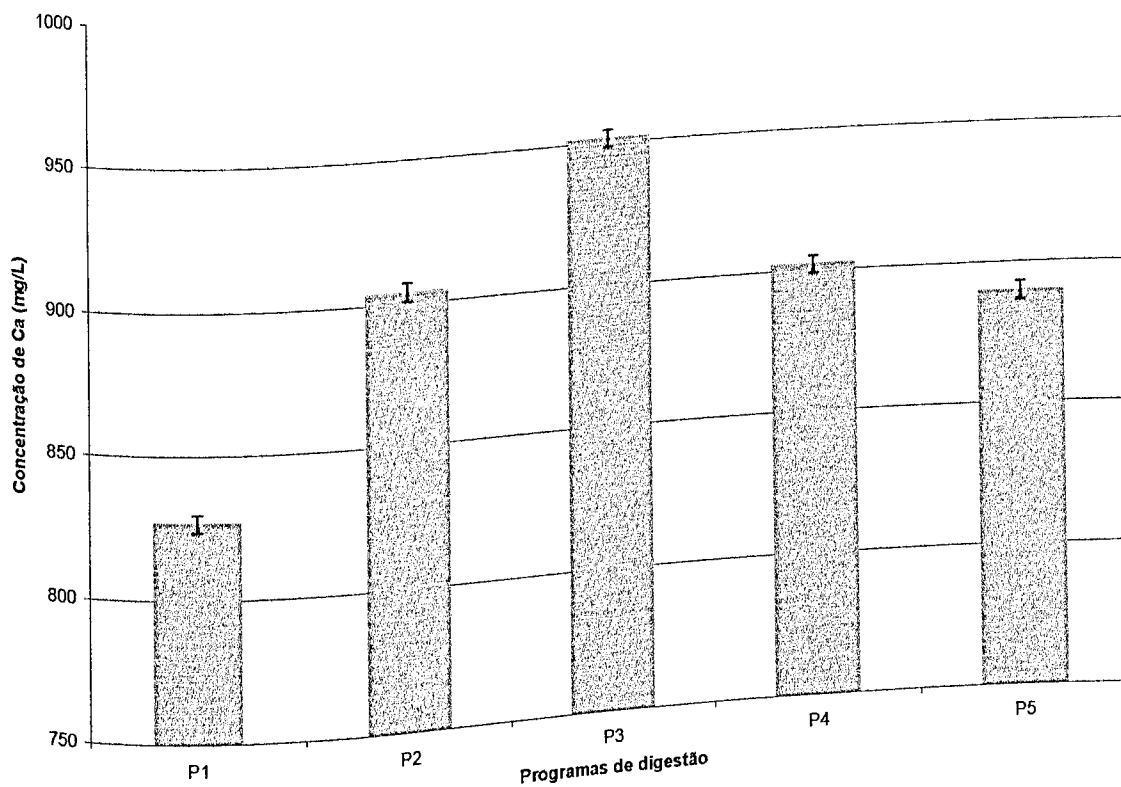


Figura 10. Efeito do tempo de digestão no preparo das amostras utilizando forno de microondas e determinação de Ca.

Condições experimentais:

Volume da amostra de leite = 0,5 mL

Volume de HNO_3 ($14,0 \text{ mol.L}^{-1}$) = 2,0 mL

Volume de H_2O_2 (30% m.v⁻¹) = 1,0 mL

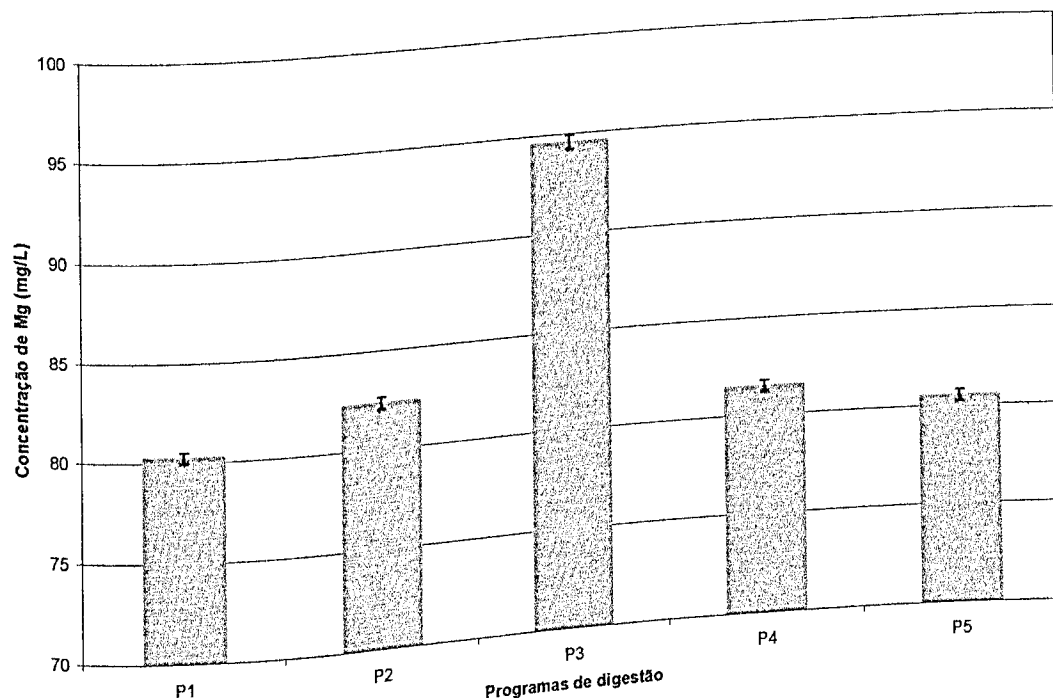


Figura 11. Efeito do tempo de digestão no preparo das amostras utilizando forno de microondas e determinação de Mg.

Condições experimentais:

Volume da amostra de leite = 0,5 mL

Volume de HNO_3 ($14,0 \text{ mol.L}^{-1}$) = 2,0 mL

Volume de H_2O_2 (30% m.v $^{-1}$) = 1,0 mL

Pela análise das Figuras 10 e 11 pode-se observar que os melhores resultados obtidos para a determinação do Ca e Mg correspondem ao programa P₃ (programa de digestão III) o qual tem duração de 12 minutos com intervalos de 3,0 a 3,0 minutos e etapas de programação da potência de 250 W; 0 W; 450 W e 650 W. Os valores obtidos para Ca e Mg com este programa foram de 951,0 e 95,0 mg.L^{-1} respectivamente, sendo que os desvios padrão relativo foram de 0,3% tanto para o Ca quanto para o Mg. Estatisticamente os resultados obtidos apresentaram grau de confiança de 95%, conforme aplicação do teste "t" pareado. O aumento do tempo de digestão que são submetidas às respectivas amostras nos outros programas mostrou menores valores para Ca e Mg. Isto pode ser observado no programa indicado por P₅ onde os valores

Dissertação de Mestrado

encontrados para Ca e Mg foram respectivamente de 802,0 e 80,4 mg.L⁻¹ e os desvios-padrão relativos de 0,4% para o Mg e 0,5 % para o Ca.

O aumento do tempo de ação das microondas sobre materiais orgânicos, sugere um aumento da pressão, ocasionada pela geração de uma maior quantidade de CO₂, NO e NO₂ o que provavelmente interfere na determinação de Ca e Mg.

Ainda com relação ao tempo de atuação das microondas nos programas indicados por P₄ e P₅, não foi possível obter a mesma velocidade analítica, uma vez que tais programas apresentaram respectivamente uma duração de 16 e 20 minutos.

Todos os experimentos foram executados em triplicata e os resultados sofreram um tratamento estatístico com aplicação do teste "t" pareado, o qual demonstrou que os programas P₄ e P₅ apresentaram uma menor determinação de Ca e Mg com grau de confiança igual a 95%.

Para o programa indicado por P₃ observamos uma melhor digestão para a extração do cálcio e do magnésio, sem incorrer na possibilidade de perdermos esses analitos por ação de fatores externos tais como volatilização, contaminação.

Observa-se também que nesse tempo de digestão obteve-se uma melhor determinação de Ca $951,3 \pm 3,0$ e de Mg $94,5 \pm 0,3$ conforme teste "t" pareado, o qual apresentou um grau de confiança superior a 95%. Como a extração do Ca e do Mg mostrou-se adequada com o emprego do programa indicado por P₃, sugere-se usar esse tempo para as digestões de amostras de leite em forno de microondas.

5.2. Amostragem direta

Os procedimentos de preparo de amostras por amostragem direta, são alternativas aos procedimentos de preparo de amostras que freqüentemente envolvem o uso de ácidos concentrados com propriedades oxidantes e/ou complexantes. Apesar dos ácidos aquecidos causarem uma digestão eficiente das amostras, as condições de trabalho devem ser adequadas para garantir a integridade do analista e a salubridade do ambiente de trabalho.

Os procedimentos que envolvem o uso de meio alcalino são convenientes, pois, exigem reduzida manipulação da amostra. Tratamento de amostras de leite em meio

alcalino foram realizadas por Stürup & Büchert (1996), os quais fizeram o tratamento de amostras de leite utilizando uma mistura de hidróxido de potássio ($0,05 \text{ mol.L}^{-1}$) e tetrametilamônio ($0,07 \text{ mol.L}^{-1}$) para a determinação de cobre e iodo, empregando o sistema de análise por injeção em fluxo (FIA) acoplado ao ICP-MS. Tentativas de determinar Al, As, Cr, Ni, Pd, Se e Pb não foram bem sucedidas devido a interferências poliatômicas ou insolubilidade dos elementos em meio alcalino.

O uso de uma mistura de reagentes orgânicos constituída por trietanolamina e trietilenotetramina (reagente CFA-C) foi realizado por Nóbrega et al. (1997) para determinação de Ca, K, Mg, Na, P e Zn. Segundo esses autores o respectivo reagente CFA-C dissocia parcial ou totalmente as micelas de caseína, estabilizando os cátions na fase líquida, que após a diluição foram obtidas suspensões límpidas para amostras de leite.

5.2.1. Estudo do efeito de soluções de MEA (Monoetanolamina) e ácido cítrico na determinação de cálcio e magnésio.

Com o objetivo de substituir o CFA-C, devido ao seu alto custo e contaminação durante o seu armazenamento, utilizou-se um reagente de propriedades semelhantes ao mesmo (NÓBREGA et al., 1997).

Foram preparadas misturas contendo aminas (MEA e TRIS) em ácido cítrico.

O ácido cítrico foi utilizado na preparação das soluções por aumentar a solubilidade das aminas e uma outra evidência da possível presença do íon citrato ou de algum outro reagente com caráter ácido no produto comercial CFA-C (SANTOS, 2002).

Para a determinação da concentração de cálcio e magnésio em amostras de leite utilizando aminas, foram feitas diversas investigações: (1) variação da concentração e do volume da solução de MEA/ ácido cítrico, mantendo-se constante o volume da amostra de leite; (2) variação da concentração de ácido cítrico, mantendo a concentração de MEA constante.

Com o objetivo de determinar a concentração ideal da mistura das aminas + ácido cítrico para uma melhor extração de Ca e Mg das amostras de leite, preparou-se soluções com variações nas concentrações das respectivas aminas.

Dissertação de Mestrado

As Figuras 12 a 17 mostram o efeito da variação do volume da solução de MEA + ácido cítrico com concentração de MEA variando de 3,0; 6,0 e 12,0 mol.L⁻¹, mantendo-se constante a concentração do ácido cítrico (0,20 mol.L⁻¹). Os volumes da solução de MEA + ácido cítrico empregados foram de 1,0; 2,0; 5,0 e 10,0 mL, e o volume para as amostras de leite foi mantido em 0,5 mL.

As Figuras 12 e 13 mostram, respectivamente, a variação da concentração de Ca e Mg quando usamos MEA numa concentração de 3,0 mol.L⁻¹ e ácido cítrico 0,20 mol.L⁻¹ para os volumes da mistura iguais a 1,0; 2,0; 5,0 e 10,0 mL, onde os resultados representam os valores médios de concentração (mg.L⁻¹) de Ca e Mg e as estimativas dos desvios padrão.

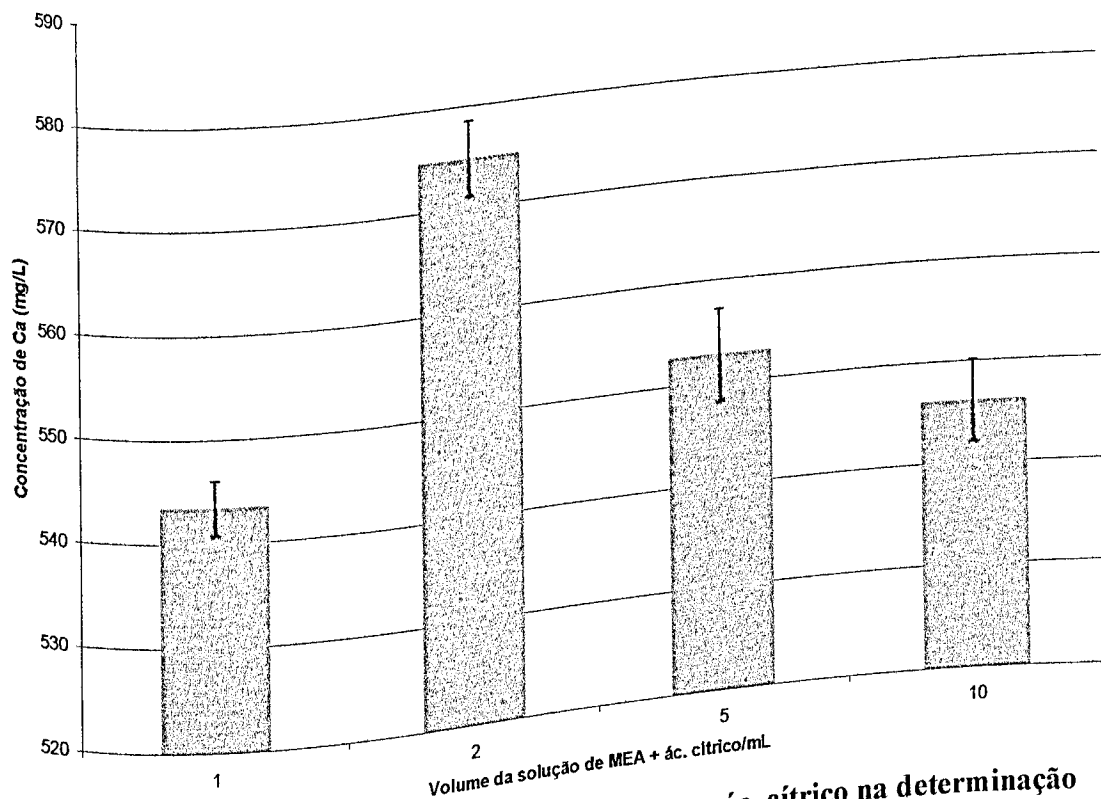


Figura 12. Efeito do volume da solução de MEA + ác. cítrico na determinação de Cálcio

Concentração de MEA = 3,0 mol.L⁻¹

Concentração de ácido cítrico = 0,20 mol.L⁻¹

Volume da amostra de leite = 0,5 mL

Dissertação de Mestrado

Mantendo-se constante a concentração de MEA ($3,0 \text{ mol.L}^{-1}$) + ác. cítrico ($0,20 \text{ mol.L}^{-1}$) e variando o volume dessa mistura observou-se que a melhor determinação para o Ca é $574,7 \pm 3,7$ que ocorreu quando usamos um volume de 2,0 mL da mistura. Todas as amostras passaram por um tratamento estatístico, onde foi executado o teste "t" pareado. Os resultados obtidos apresentaram um grau de confiança de 95% para as amostras analisadas.

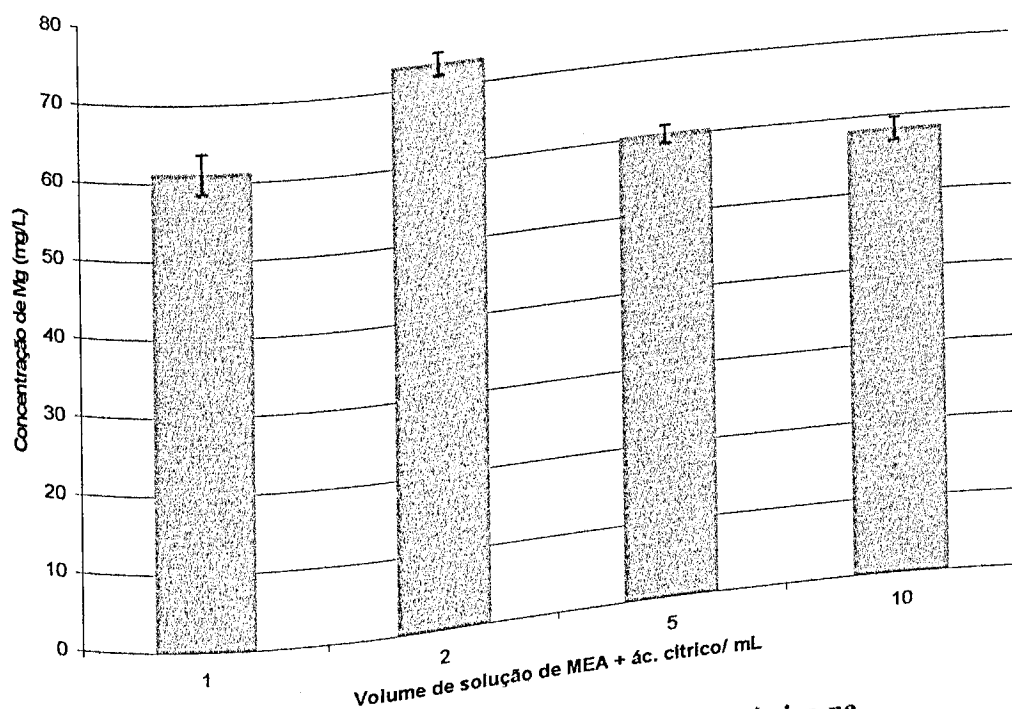


Figura 13. Efeito do volume da solução de MEA + ac. cítrico na determinação de Magnésio

Concentração de MEA = $3,0 \text{ mol.L}^{-1}$

Concentração de ácido cítrico = $0,20 \text{ mol.L}^{-1}$

Volume da amostra de leite = 0,5 mL

Estatisticamente, verificou-se que a melhor extração para o Mg em soluções de MEA + ác. cítrico foi para o volume de 2,0 mL, obtendo-se os valores médios de concentração (mg.L^{-1}) \pm desvio padrão, $73,0 \pm 1,4$ conforme teste "t" pareado que apresentou grau de confiança igual a 95%.

Dissertação de Mestrado

As Figuras 14 e 15 mostram a variação da concentração de Ca e Mg quando usamos MEA na concentração de $6,0 \text{ mol.L}^{-1}$, mantendo constante a concentração do ácido cítrico de $0,20 \text{ mol.L}^{-1}$ para volumes da mistura iguais a 1,0; 2,0; 5,0 e 10,0 mL.

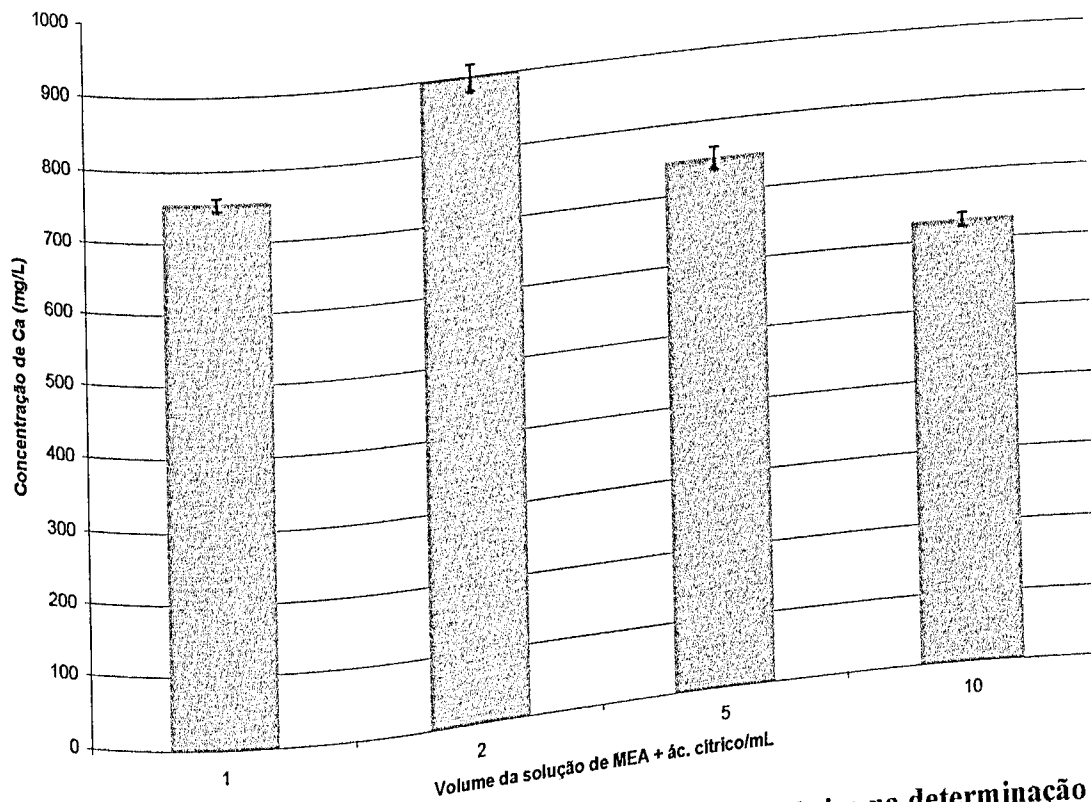


Figura 14. Efeito do volume da solução de MEA + ác. cítrico na determinação de Cálcio

Concentração de MEA = $6,0 \text{ mol.L}^{-1}$

Concentração de ácido cítrico = $0,20 \text{ mol.L}^{-1}$

Volume da amostra de leite = 0,5 mL

Todas as amostras passaram por um tratamento estatístico, onde foi executado o teste "t" pareado, o resultado obtido indicou uma melhor extração do Ca (mg.L^{-1}) igual a $898,1 \pm 1,8$ com grau de confiança igual a 95%.

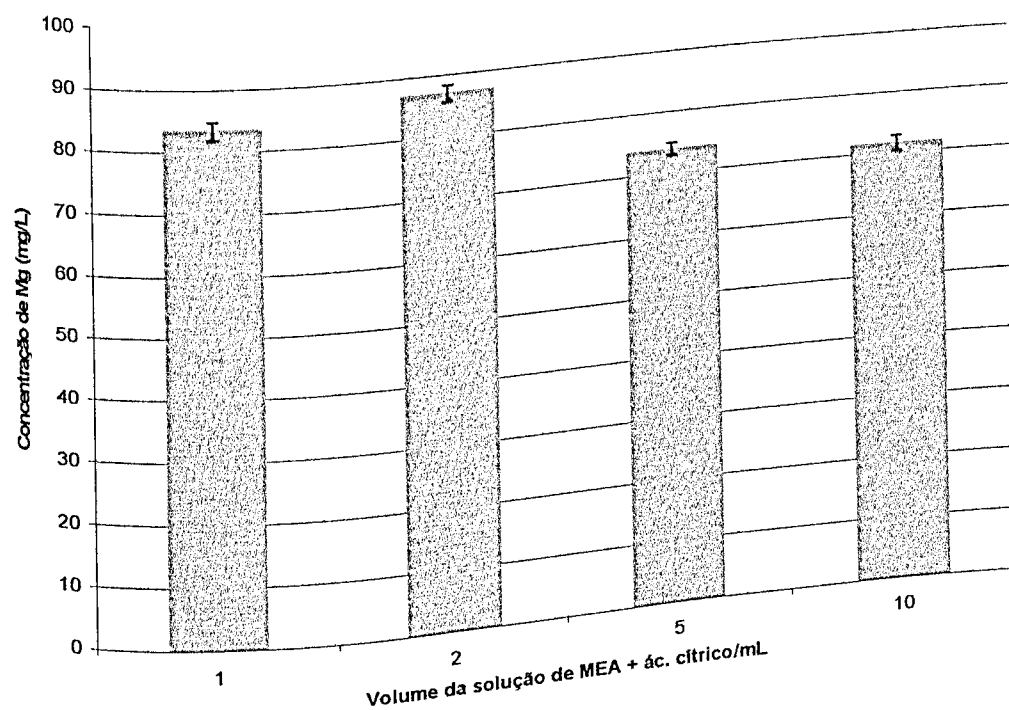


Figura 15. Efeito do volume da solução de MEA + ac. cítrico na determinação de Magnésio

Concentração de MEA = $6,0 \text{ mol.L}^{-1}$

Concentração de ácido cítrico = $0,20 \text{ mol.L}^{-1}$

Volume da amostra de leite = $0,5 \text{ mL}$

As respectivas amostras passaram por um tratamento estatístico, sendo executado o teste "t" pareado. Observou-se uma maior extração de Mg (mg.L^{-1}) \pm desvio padrão igual a $86,9 \pm 1,3$ para o volume da mistura de $2,0 \text{ mL}$.

As Figuras 16 e 17 mostram a variação da concentração de Ca e Mg quando usamos MEA numa concentração de $12,0 \text{ mol.L}^{-1}$ e ácido cítrico de $0,20 \text{ mol.L}^{-1}$ para volumes da mistura iguais a $1,0$; $2,0$; $5,0$ e $10,0 \text{ mL}$.

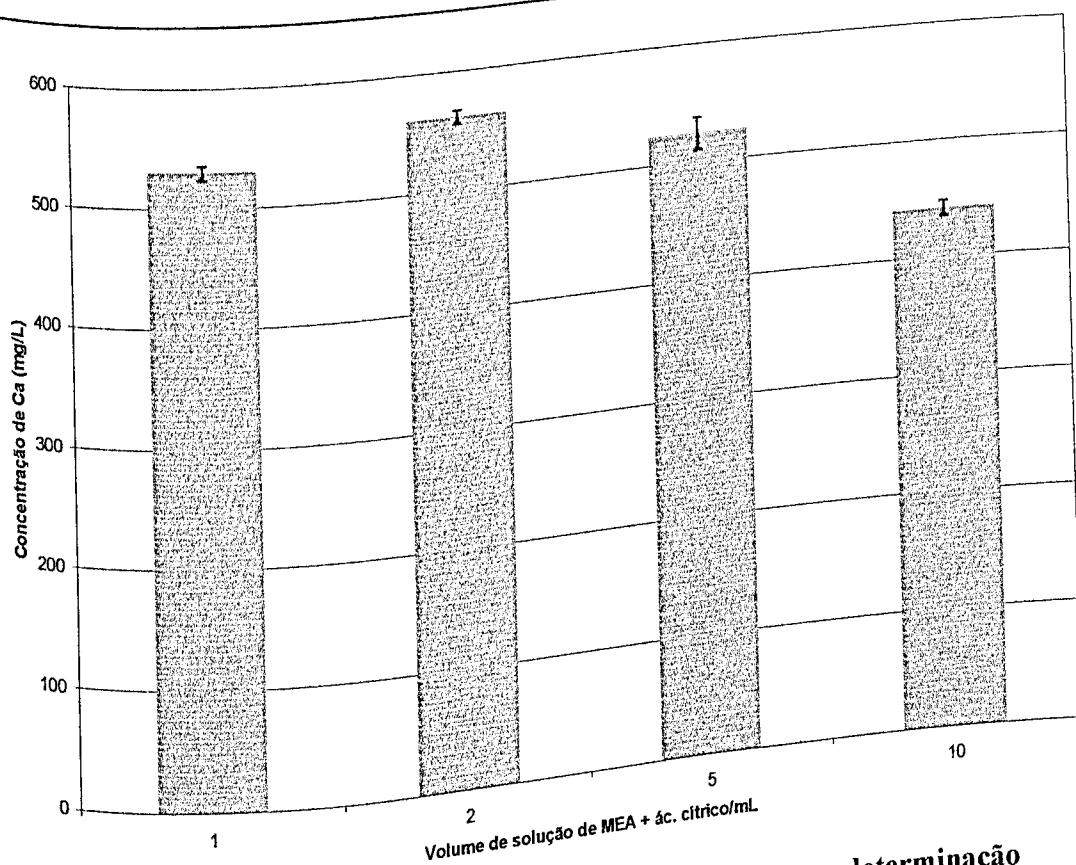


Figura 16. Efeito do volume da solução de MEA/ac. cítrico na determinação de Cálcio

Concentração de MEA = $12,0 \text{ mol.L}^{-1}$

Concentração de ácido cítrico = $0,20 \text{ mol.L}^{-1}$

Volume da amostra de leite = $0,5 \text{ mL}$

Assim como os resultados obtidos anteriormente, a melhor determinação para o Ca (mg.L^{-1}) \pm desvio padrão $560,8 \pm 5,9$ foi obtido quando se utilizou $2,0 \text{ mL}$ da solução de MEA + ác. cítrico de concentração igual a $12,0 \text{ mol.L}^{-1}$.

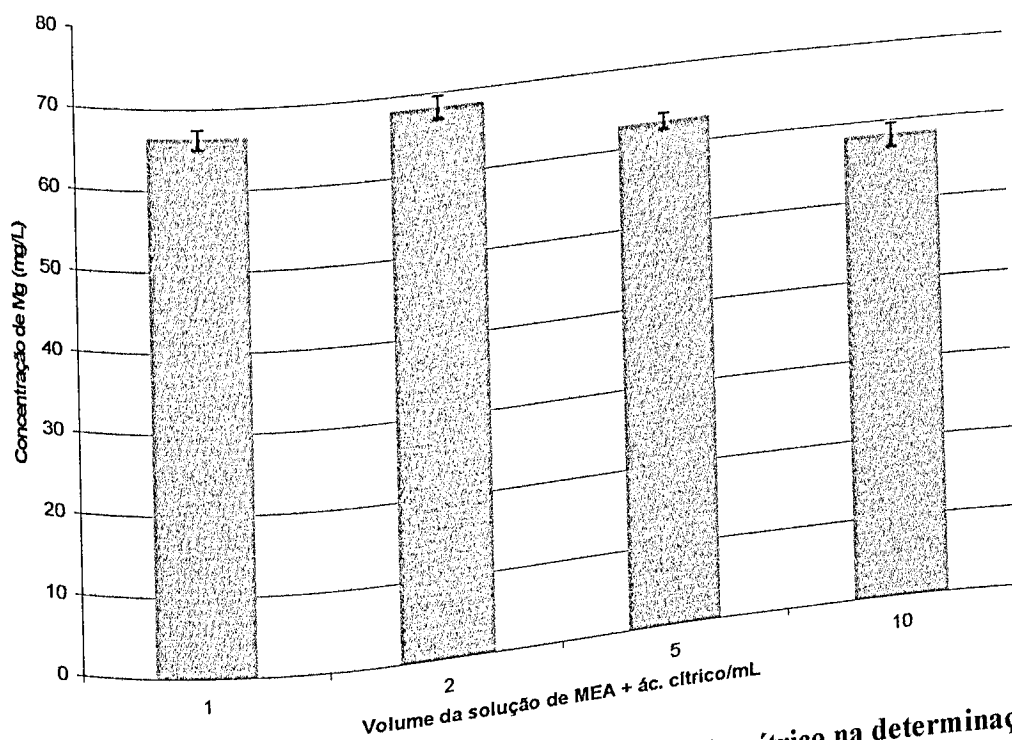


Figura 17. Efeito do volume da solução de MEA + ác. cítrico na determinação de

Magnésio

Concentração de MEA = $12,0 \text{ mol.L}^{-1}$

Concentração de ácido cítrico = $0,20 \text{ mol.L}^{-1}$

Volume da amostra de leite = $0,5 \text{ mL}$

Os resultados obtidos para a determinação do Mg com MEA + ác. cítrico $12,0 \text{ mol.L}^{-1}$, demonstraram estatisticamente que a melhor determinação em mg.L^{-1} foi de $68,1 \pm 1,4$ quando utilizou-se $2,0 \text{ mL}$ da mistura. Os outros diferentes volumes analisados apresentaram um grau de confiança de 95%.

Na Tabela 12 estão apresentados os resultados do efeito da concentração de MEA na determinação de Ca e Mg, mantendo volume constante de $2,0 \text{ mL}$ da mistura de MEA + ác. cítrico ($0,20 \text{ mol.L}^{-1}$) para $0,5 \text{ mL}$ de leite.

Tabela 12. Efeito da concentração de MEA na determinação de Ca e Mg mantendo volume constante para a solução MEA + ácido cítrico 0,2 mol.L⁻¹.
Volume da amostra de leite = 0,5 mL
Volume de MEA + ác. cítrico = 2,0 mL
Concentração de ác. cítrico = 0,20 mol.L⁻¹

Concentração de MEA (mol.L ⁻¹)	Concentração de Ca (mg.L ⁻¹)	Concentração de Mg (mg.L ⁻¹)
		73,0 ± 2,5
3,0	574,7 ± 3,7	86,9 ± 1,3
6,0	898,1 ± 8,7	67,9 ± 0,7
12,0	560,8 ± 5,9	

Pela análise das Figuras de números 12 a 17 e da Tabela 12 observa-se que dentro do intervalo de concentração de MEA estudado, a solução de MEA recomendada para determinação de cálcio e magnésio é a que apresenta concentração igual a 6,0 mol.L⁻¹, por ser a que apresentou melhor extração dos analitos quando comparada às soluções de MEA de diferentes concentrações. Sugere-se que a concentração de MEA igual 6,0 mol.L⁻¹ seja idêntica às concentrações das aminas no CFC-A (NÓBREGA et al. 2002). O volume da respectiva solução deve ser igual a 2,0 mL, pois para esse volume as estimativas dos desvios padrão relativo foram de 0,4% a 0,2% para o cálcio e magnésio, respectivamente, sendo esse o volume que forneceu maior precisão dos dados obtidos quando comparados com os volumes de 1,0; 5,0 e 10,0 mL. Observou-se ainda que quando utilizamos MEA, numa concentração de 12,0 mol.L⁻¹ ocorre a formação de uma solução de maior viscosidade, o que dificulta a extração e conseqüente determinação de Ca e Mg na espectrometria de absorção atômica por chama. Os valores do “branco” variaram de 0,01 a 0,04 mg.L⁻¹ para o Mg e de 0,02 a 0,06 mg.L⁻¹ para o Ca.

Para avaliar o efeito do ácido cítrico na determinação de cálcio e magnésio, mantendo-se constante a concentração de MEA (6,0 mol.L⁻¹), foram realizados estudos variando a concentração de ácido cítrico de 0,1 a 0,5 mol.L⁻¹. Os resultados representados na Tabela 13 e nas Figuras 18 e 19 representam os valores médios de concentração

Dissertação de Mestrado

(mg.L⁻¹) e as estimativas do desvio-padrão. Todos os resultados foram submetidos a um tratamento estatístico com aplicação do teste "t" pareado.

Tabela 13. Efeito da concentração do ácido cítrico na determinação da concentração de Ca e Mg.

Volume da amostra de leite = 0,5 mL

Volume da solução de MEA + ácido cítrico = 2,0 mL

Concentração de MEA = 6,0 mol.L⁻¹

Concentração de ác.cítrico / mol . L ⁻¹	Conc. de MEA (6,0 mol.L ⁻¹)	
	Concentração de Ca / mg . L ⁻¹	Concentração de Mg / mg . L ⁻¹
0,1	636,3 ± 2,6	70,6 ± 3,2
0,2	860,5 ± 1,8	80,2 ± 2,6
0,3	537,5 ± 2,3	42,1 ± 5,4
0,4	476,0 ± 2,2	40,2 ± 6,4
0,5	435,3 ± 2,3	40,2 ± 7,7

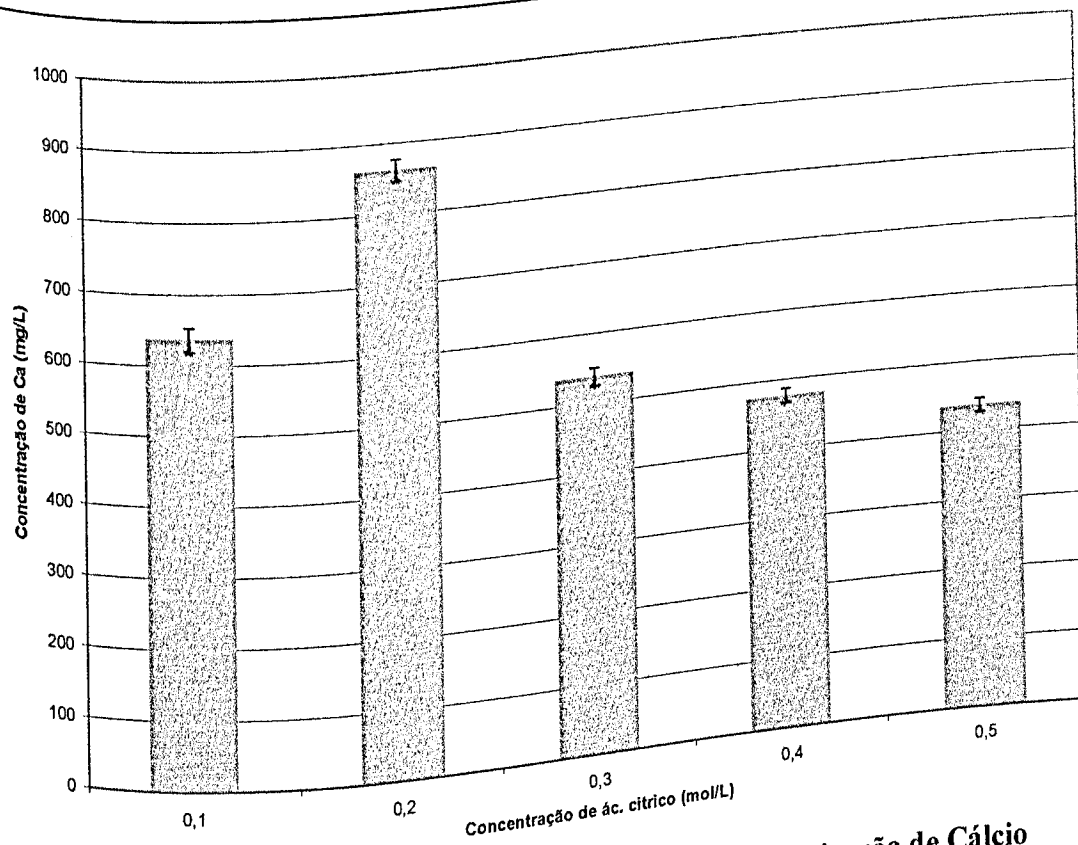


Figura 18. Efeito da concentração de ác. cítrico na determinação de Cálcio utilizando MEA = $6,0 \text{ mol.L}^{-1}$

Volume da amostra de leite = 0,5 mL

Volume da solução de MEA + ácido cítrico = 2,0 mL

Concentração de MEA = $6,0 \text{ mol.L}^{-1}$

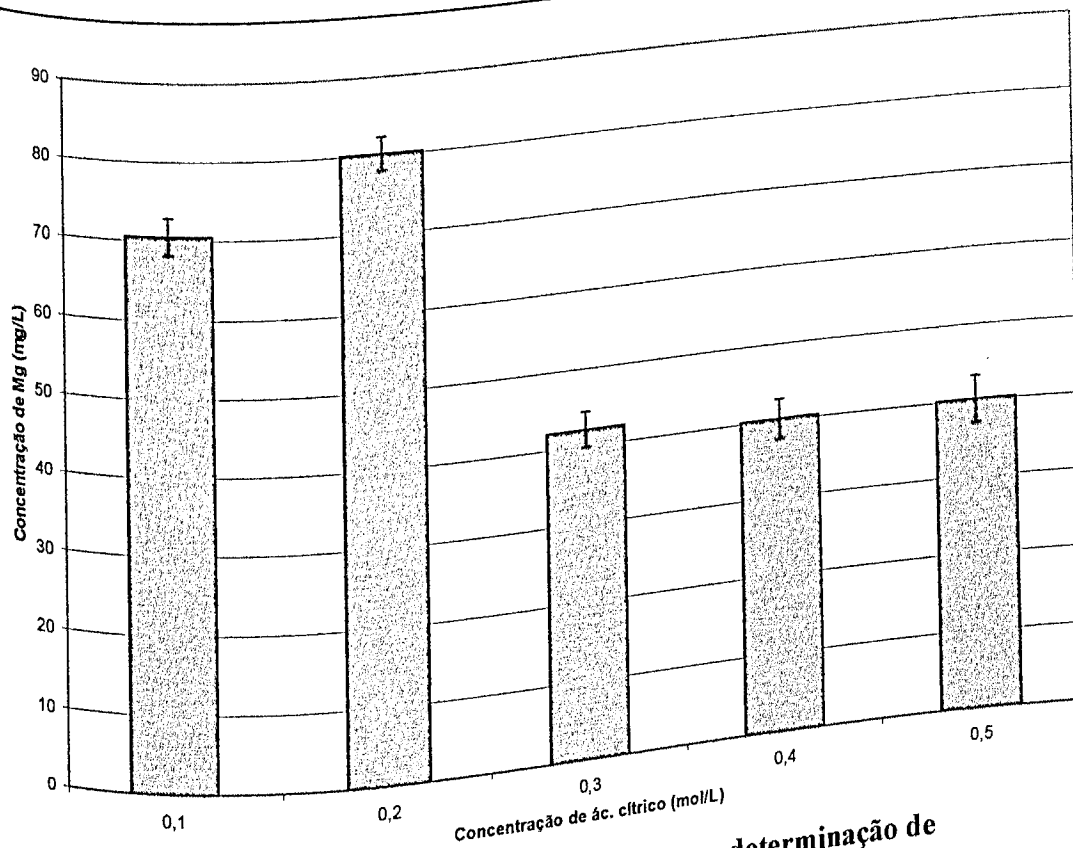


Figura 19. Efeito da concentração de ác. cítrico na determinação de Magnésio utilizando MEA = 6,0 mol.L⁻¹

Volume da amostra de leite = 0,5 mL

Volume da solução de MEA + ácido cítrico = 2,0 mL

Concentração de MEA = 6,0 mol.L⁻¹

Os resultados obtidos e representados na Tabela 13 e nas Figuras 18 e 19 foram submetidos a um tratamento estatístico (grau de confiança de 95%). Da análise estatística de todas as concentrações de ácido cítrico investigadas a ideal para a determinação do Ca ($860,5 \text{ mg.L}^{-1} \pm 1,8$) e Mg ($80,2 \text{ mg.L}^{-1} \pm 2,6$) foi de $0,20 \text{ mol.L}^{-1}$, mantendo constante a concentração de MEA ($6,0 \text{ mol.L}^{-1}$), por apresentar uma maior eficiência de extração e precisão.

Sugere-se que quantidades crescentes de ácido cítrico interferem negativamente na determinação de cálcio e magnésio, pois ocorre aumento da concentração de citratos, os quais podem interagir com as micelas de caseína, complexando os analitos investigados.

5.2.2. Estudo do efeito de soluções de TRIS (Trishidroximetilaminometano) e ácido cítrico no preparo das amostras de leite.

Para estudo da influência de TRIS na determinação da concentração de Ca e Mg foram preparadas soluções em que variaram as concentrações de TRIS (1,5; 1,0 e 0,5 mol.L⁻¹) e de ácido cítrico (0,05 mol.L⁻¹), mantendo constante o volume da amostra de leite em 0,5 mL. Todas as amostras foram feitas em triplicata. A variação da concentração tem como principal objetivo estabelecer a concentração ideal para a determinação de Ca e Mg. As soluções com diferentes concentrações foram submetidas a um tratamento estatístico com a aplicação do teste "t" pareado. Variou-se o volume da solução de TRIS + ácido cítrico procurando estabelecer o volume ideal da respectiva solução para uma melhor determinação de Ca e Mg por espectrometria de absorção atômica por chama. Os resultados deste estudo estão apresentados nas Figuras 20 a 25 e na Tabela 14 onde os resultados representam os valores médios de concentração (mg.L⁻¹) de Ca e Mg e as estimativas de desvio-padrão.

As Figuras 20 e 21 mostram a variação da concentração de Ca e Mg quando a concentração de TRIS é igual a 1,5 mol.L⁻¹ e de ácido cítrico em 0,05 mol.L⁻¹, variando o volume da mistura.

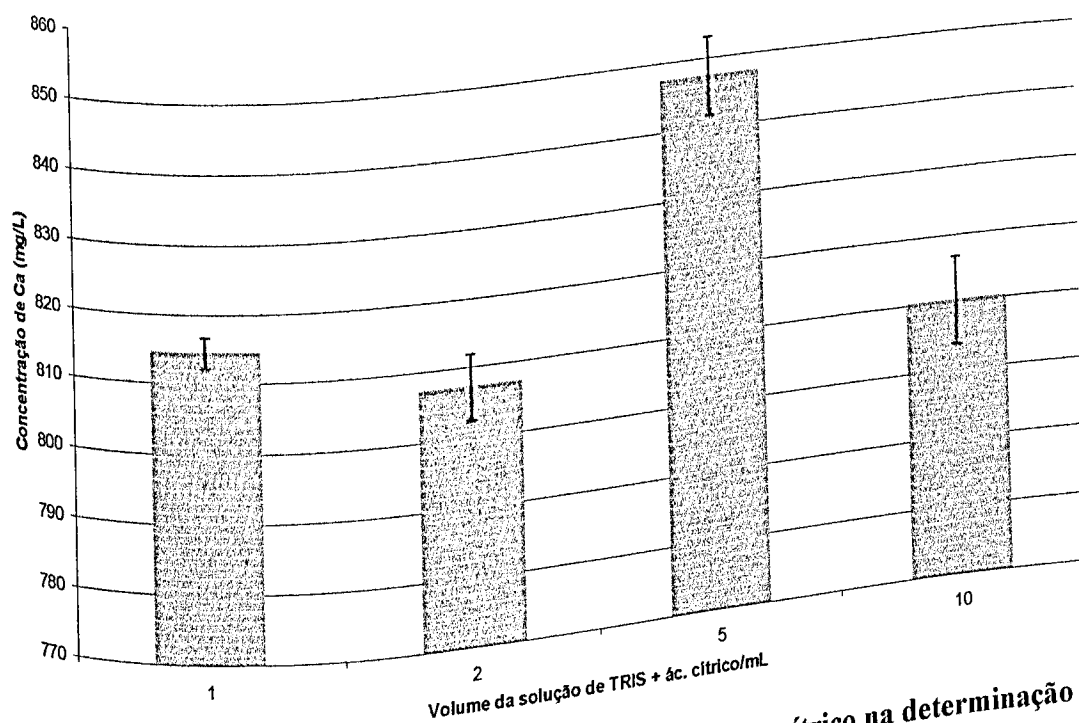


Figura 20. Efeito do volume da solução de TRIS + ác. cítrico na determinação de Cálcio

Concentração de TRIS = $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$

Volume da amostra de leite = $0,5 \text{ mL}$

Concentração do ácido cítrico = $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$

O melhor volume para a determinação do Ca quando se utiliza TRIS numa concentração de $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$ corresponde a $5,0 \text{ mL}$, pois o mesmo fornece uma concentração média (mg.L^{-1}) \pm desvio padrão igual a $847,4 \pm 5,7$ com grau de confiança de 95%. Para os valores de $1,0$; $2,0$ e $10,0 \text{ mL}$, os resultados obtidos apresentaram menor precisão.

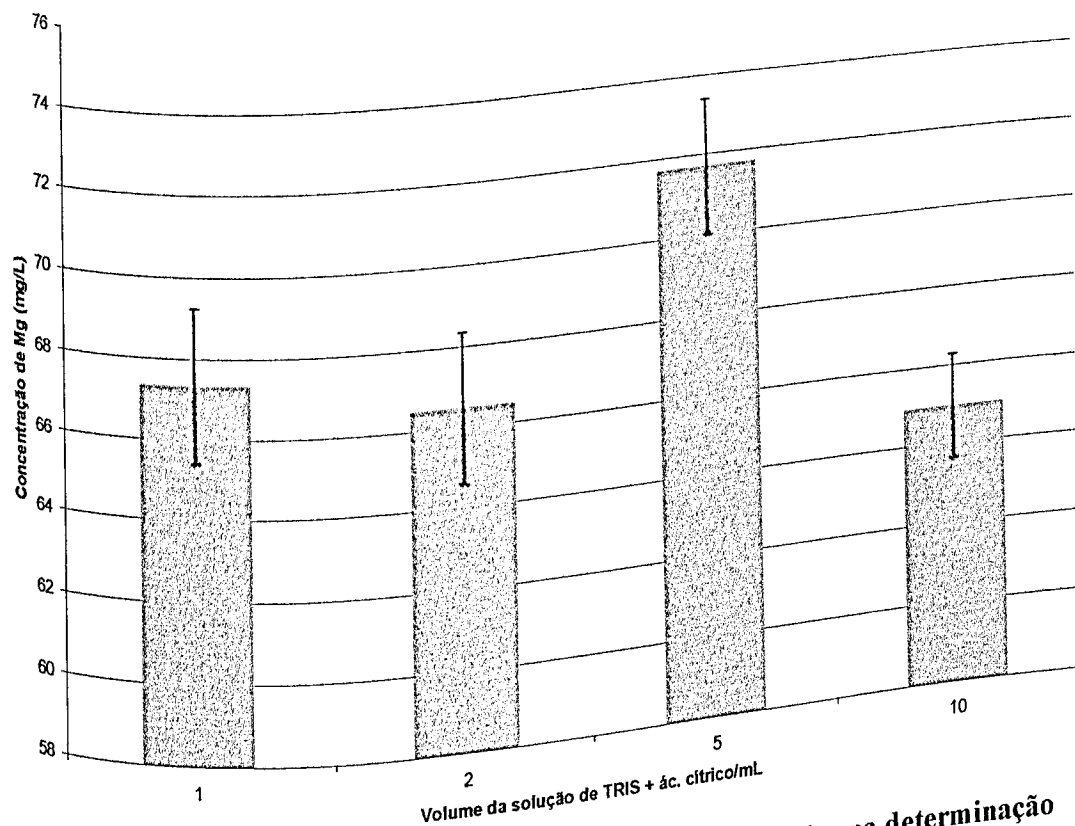


Figura 21- Efeito do volume da solução de TRIS/ ác. cítrico na determinação de Magnésio

Concentração de TRIS = $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$

Volume da amostra de leite = 0,5 mL

Concentração do ácido cítrico = $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$

Os resultados apresentados pelos gráficos 20 e 21 revelaram que o melhor volume para a determinação de Ca e Mg quando se utiliza TRIS numa concentração de $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$ e ácido cítrico $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ corresponde a 5,0 mL, pois, o mesmo fornece uma concentração média (mg.L^{-1}) \pm desvio padrão respectivamente de $847,4 \pm 5,7$ para o Ca e $71,7 \pm 0,4$ para o Mg, com grau de confiança de 95%. Para os volumes de 1,0; 2,0 e 10,0 mL tanto para o Ca quanto para o Mg os resultados apresentaram menores valores tanto para o Ca quanto para o Mg.

As Figuras 22 e 23 mostram o efeito do volume de TRIS na determinação de cálcio e magnésio, quando usamos TRIS numa concentração de $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$, mantendo-se constante a concentração de ácido cítrico em $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$, para 0,5 mL da amostra de leite.

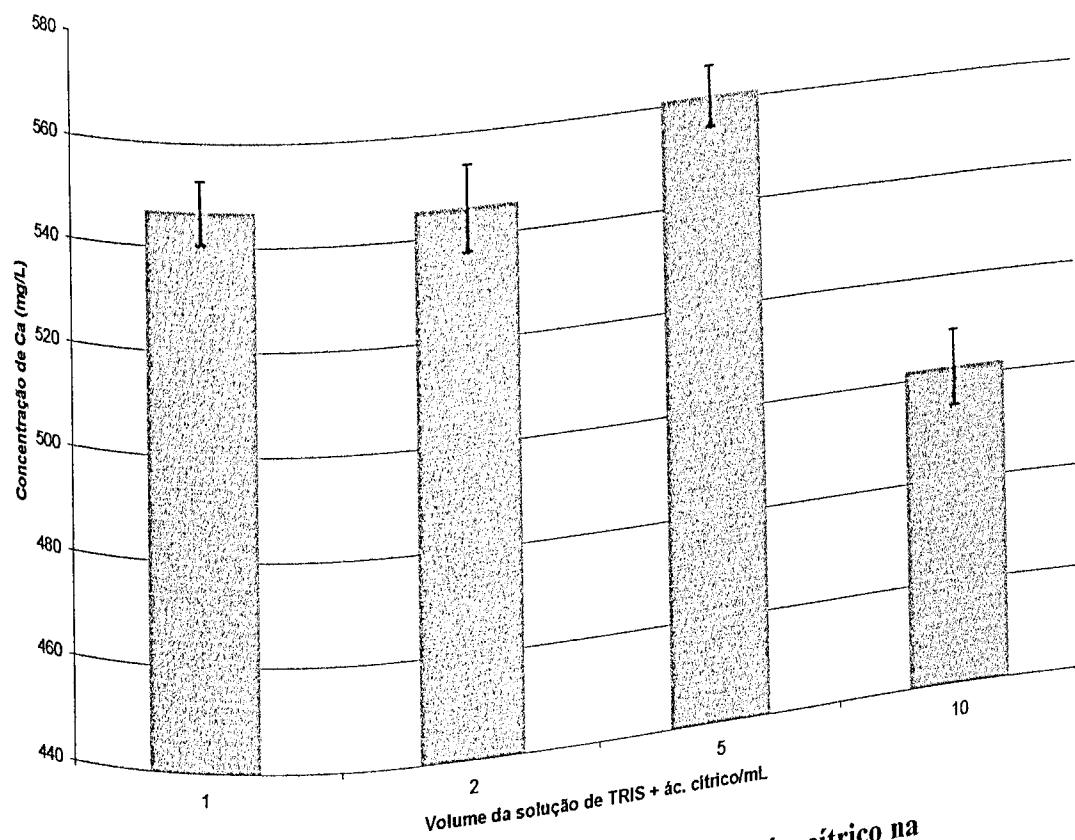


Figura 22. Efeito do volume da solução de TRIS + ác. cítrico na determinação de Cálcio
Concentração de TRIS = $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$
Volume da amostra de leite = $0,5 \text{ mL}$
Concentração do ácido cítrico = $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$

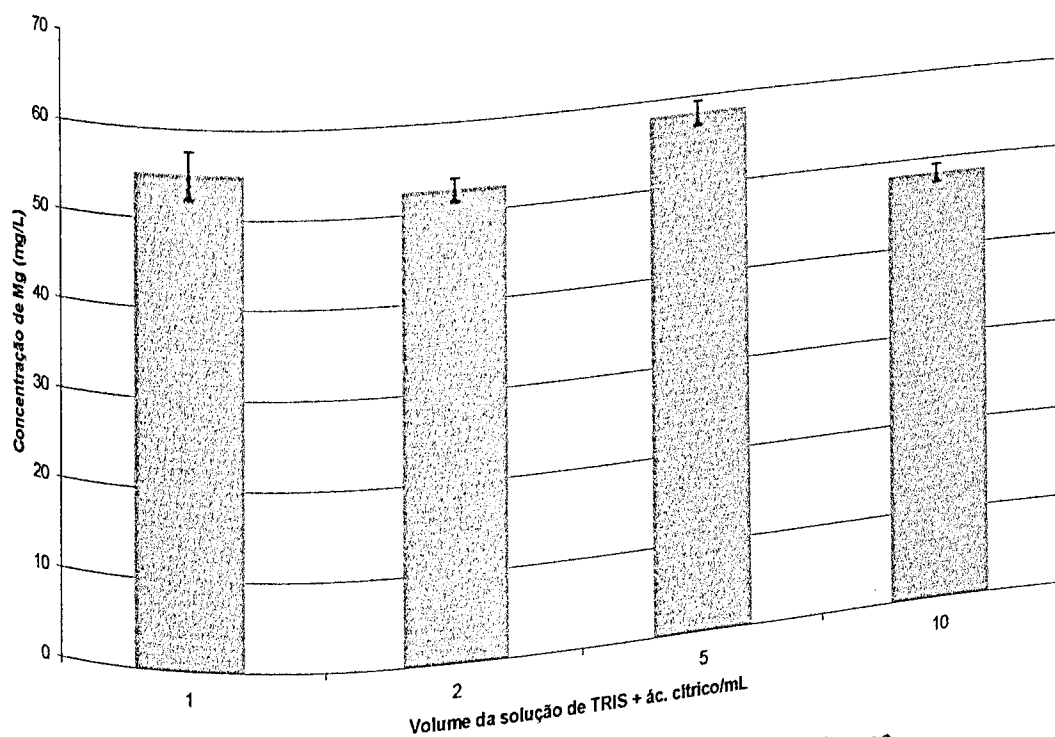


Figura 23. Efeito do volume da solução de TRIS + ác. cítrico na determinação de Magnésio

Concentração de TRIS = $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$

Volume da amostra de leite = $0,5 \text{ mL}$

Concentração do ácido cítrico = $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$

Analisando os resultados apresentados nas Figuras 22 e 23 pode-se notar que a diminuição da concentração de TRIS para $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$, mantendo constante a concentração de ácido cítrico ($0,05 \text{ mol.L}^{-1}$), interferiu negativamente na determinação do Ca e do Mg. Os valores obtidos representam a média das concentrações (mg.L^{-1}) de Ca e Mg e as estimativas de desvio padrão e são iguais a $560,7 \pm 5,9$ e $58,0 \pm 1,3$; respectivamente para o Ca e o Mg, para um volume da solução de TRIS + ácido cítrico igual a $5,0 \text{ mL}$. Para o volume de $10,0 \text{ mL}$ da solução de TRIS + ácido cítrico, observa-se um decréscimo nos valores de Ca e Mg o que pode ser justificado devido ao aumento da viscosidade do meio, dificultando a nebulização da amostra no FAAS.

As Figuras 24 e 25 mostram o efeito do volume de TRIS na determinação de cálcio e magnésio quando utilizamos TRIS numa concentração de $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$, mantendo constante a concentração de ac. cítrico em $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ e o volume da amostra de leite em $0,5 \text{ mL}$.

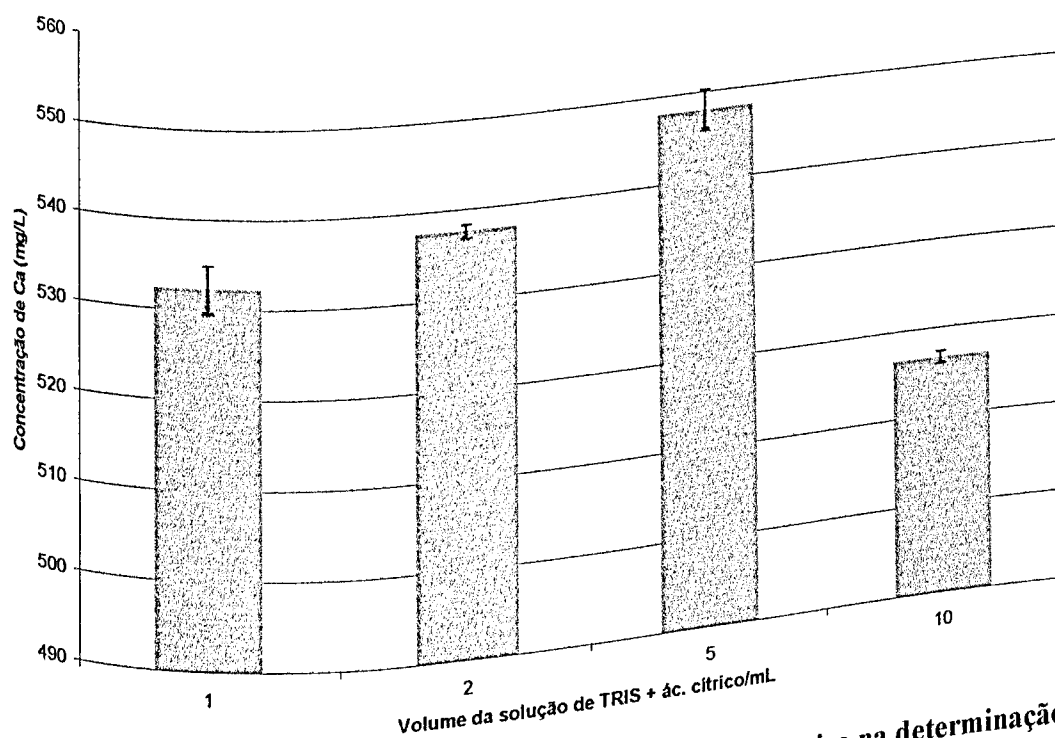


Figura 24. Efeito do volume da solução de TRIS + ác. cítrico na determinação de Cálcio

Concentração de TRIS = $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$

Volume da amostra de leite = $0,5 \text{ mL}$

Concentração do ácido cítrico = $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$

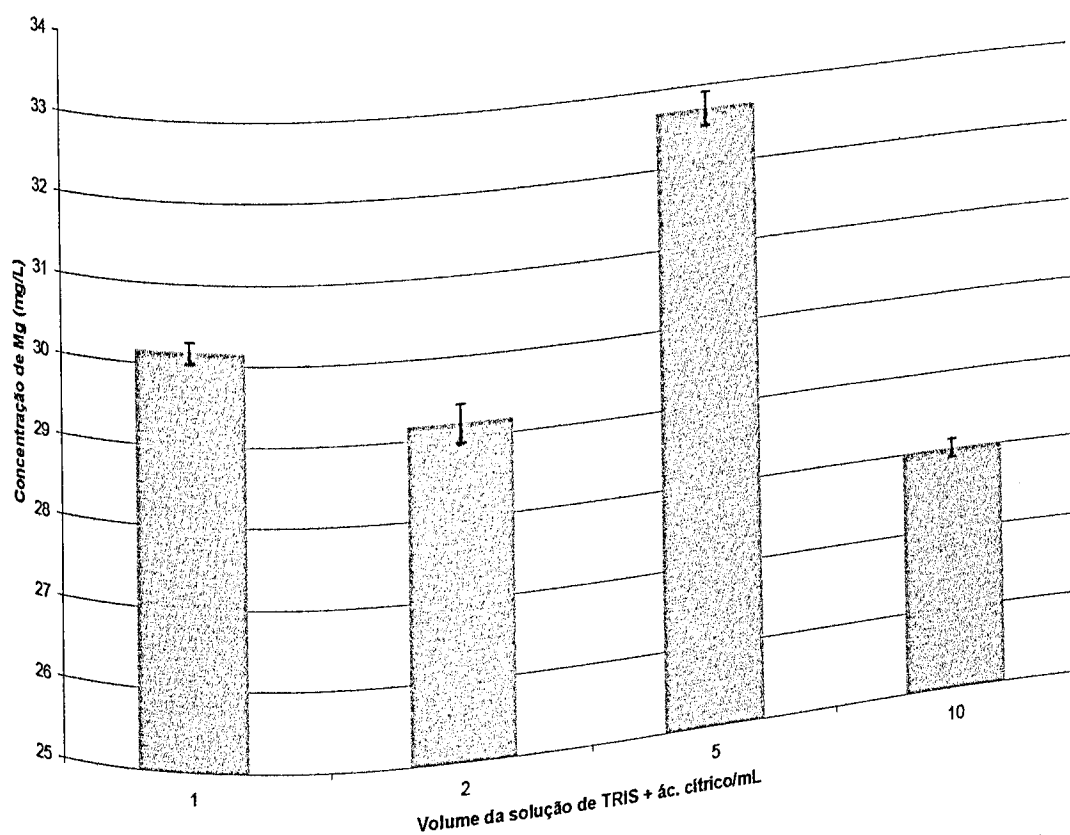


Figura 25. Efeito do volume da solução de TRIS + ác. cítrico na determinação

de Magnésio

Concentração de TRIS = $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$

Volume da amostra de leite = $0,5 \text{ mL}$

Concentração do ácido cítrico = $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$

A análise das Figuras 24 e 25 demonstram que a redução da concentração de TRIS interfere negativamente na determinação de Ca e Mg. Por outro lado, verificou-se que a diminuição da concentração de TRIS altera o aspecto da suspensão, a qual apresenta-se mais densa, provocando problemas na aspiração quando suas concentrações são quantificadas no espectrômetro de absorção atômica por chama.

A Tabela 14 refere-se ao efeito da concentração de TRIS na determinação do Ca e Mg mantendo o volume de $5,0 \text{ mL}$ de solução de TRIS + ac. cítrico, por ser de acordo com os resultados obtidos e estatisticamente analisado, o volume da solução que apresenta melhor determinação de Ca e Mg com grau de confiança superior a 95% conforme teste

"t" pareado. O volume da amostra de leite utilizado foi mantido constante em 0,5 mL, assim como a concentração do ácido cítrico ($0,05 \text{ mol.L}^{-1}$).

Tabela 14. Efeito da concentração de TRIS na determinação de Ca e Mg mantendo constante o volume da solução de TRIS + ác. cítrico.

Volume de amostra de leite = 0,5 mL

Volume de TRIS + ácido cítrico = 5,0 mL

Concentração de ácido cítrico = $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$

Concentração de TRIS / mol.L^{-1}	Concentração de Ca / (mg.L^{-1})	Concentração de Mg / (mg.L^{-1})
0,5	$547,0 \pm 2,3$	$31,6 \pm 0,22$
1,0	$559,7 \pm 5,9$	$57,6 \pm 1,37$
1,5	$847,2 \pm 5,7$	$71,6 \pm 0,35$

Pela análise das Figuras 20 a 25 e da Tabela 14, observou-se que dentro das variações da concentração de TRIS estudadas a concentração sugerida é de $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$ e que o melhor volume da solução de TRIS + ac. cítrico para se fazer determinação de Ca e Mg recomenda-se ser igual a 5,0 mL, sendo que para esse volume os resultados obtidos apresentaram um grau de confiança de 95% e desvios padrão relativo de 0,6% para o Ca e 0,5% para Mg. Observou-se também que para esse volume os valores do "branco" variaram de 0,7 a $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ para o cálcio e de 0,06 a $0,08 \text{ mg.L}^{-1}$ para o magnésio.

Com o objetivo de analisar a atuação do ácido cítrico na determinação de Ca e Mg foram preparadas soluções mantendo-se constante a concentração de TRIS em $1,50 \text{ mol.L}^{-1}$, variando a concentração de ácido cítrico em 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$.

O volume utilizado das soluções de TRIS + ácido cítrico em diferentes concentrações foi de 5,0 mL, ao qual foi adicionado 0,5 mL de amostra de leite.

As Figuras 26 e 27 mostram o efeito da concentração de ácido cítrico na determinação de cálcio e magnésio.

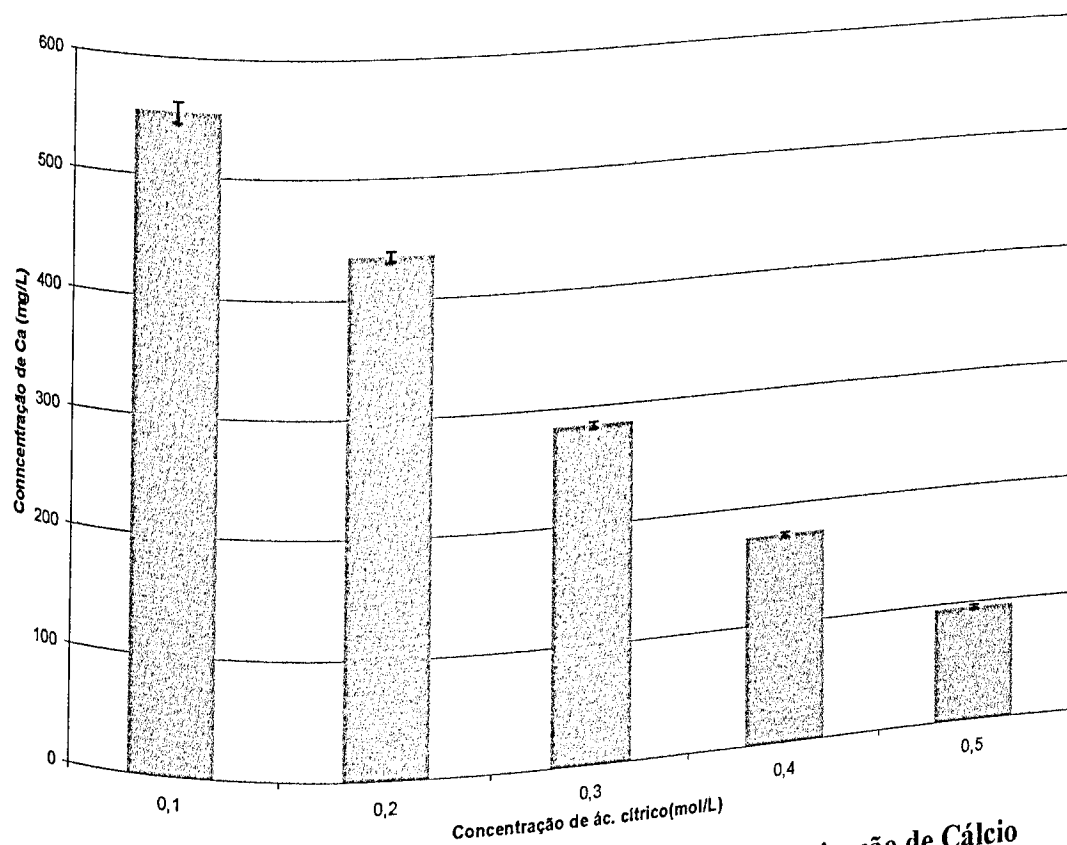


Figura 26. Efeito da concentração de ác. cítrico na determinação de Cálcio utilizando TRIS $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$

Concentração de TRIS = $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$

Volume da solução de TRIS + ac. cítrico = 5,0 mL

Volume da amostra de leite = 0,5 mL

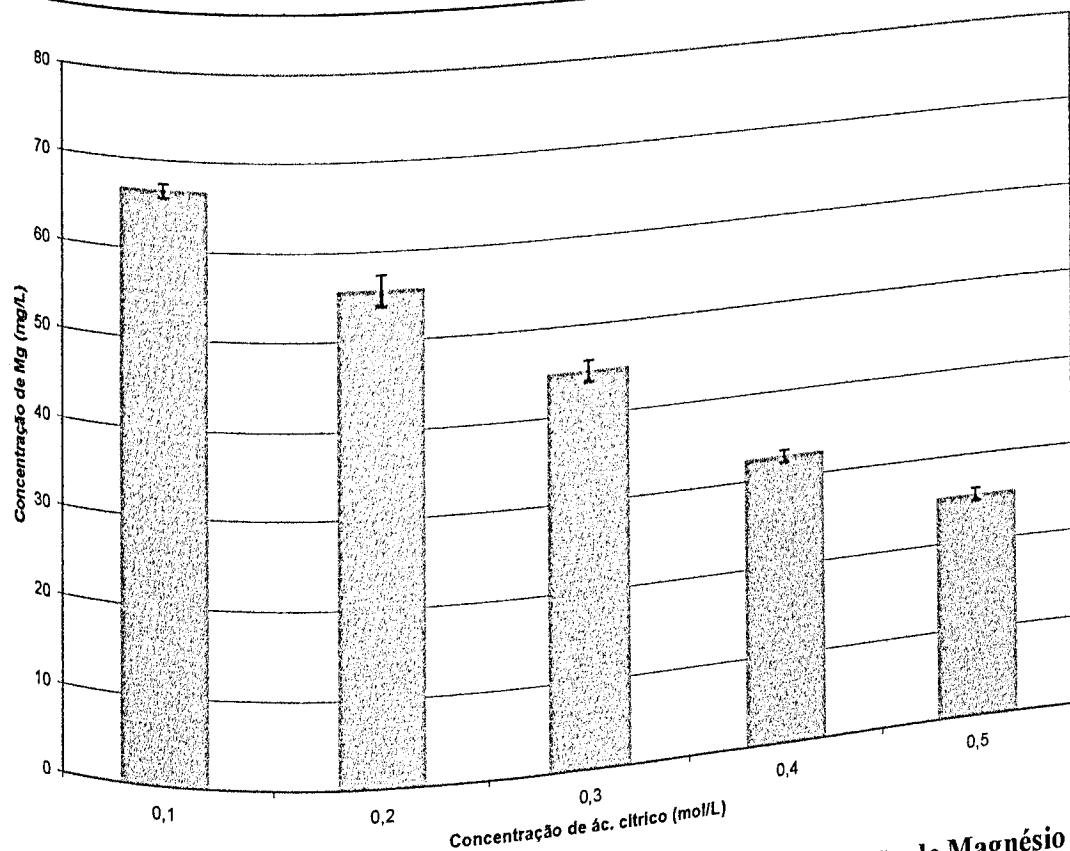


Figura 27. Efeito da concentração de ác. cítrico na determinação de Magnésio utilizando TRIS $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$

Concentração de TRIS = $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$

Volume da solução de TRIS + ac. cítrico = 5,0 mL

Volume da amostra de leite = 0,5 mL

Pela análise das Figuras 26 e 27 verifica-se que o aumento da concentração de ácido cítrico em soluções, onde se manteve constante a concentração de TRIS, provocou uma diminuição na concentração de Ca e Mg quando comparados às soluções de concentrações recomendadas no presente trabalho, no valor de $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de TRIS + ácido cítrico $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$.

Pela comparação dos resultados obtidos na determinação de Ca e Mg com variação na concentração molar de ácido cítrico na misturas de aminas utilizadas no presente trabalho, verificou-se uma interferência negativa, o que sugere um aumento da formação de citratos, os quais podem interagir com as micelas de caseína, complexando os analitos investigados. Os resultados mostraram que os desvios padrão relativo variaram de 0,9 a 1,5 % para o cálcio e de 0,5 a 0,9% para o magnésio e aplicação do teste "t" pareado

resultou em um grau de confiança de 95% para todas as amostras analisadas, tanto para a determinação do Ca como do Mg.

Para comprovar a eficiência da mistura de aminos na análise de amostras de leite em suspensão e a digestão das amostras de leite em forno de microondas, foram realizadas aspirações diretas de amostras de leite no espectrômetro de absorção atômica por chama. Além de menores valores obtidos na determinação na concentração de Ca e Mg (valores médios da concentração $\text{mg.L}^{-1} \pm \text{desvio-padrão}$) ocorreu também o entupimento do capilar que conduz as amostras à câmara de nebulização. Para essa investigação colocou-se 0,5 mL de leite em um balão volumétrico de 25,0 mL, completando-o com água desionizada. A seguir foi necessário diluir 10 vezes a respectiva mistura. Todas as amostras foram feitas em triplicatas, e a média dos valores da concentração obtida (mg.L^{-1}) foi de 47,3 para o Mg e 421,0 para o Ca. Todas as amostras foram submetidas a um tratamento estatístico e os resultados mostraram que os desvios-padrão relativos foram de 0,7% para o Ca e 0,5% para o Mg.

5.3. Validação da Metodologia

A Tabela 15 mostra os resultados obtidos para a determinação da concentração de Ca e Mg em diversas marcas de leite. Para todas as análises, foram utilizados os mesmos lotes utilizando os métodos analíticos propostos no presente trabalho e o convencional. Utilizando o forno de microondas com cavidade e analisando 0,5 mL de leite de diversas marcas encontradas no comércio de Uberlândia, os resultados obtidos para cálcio variaram de $842,7 \pm 6,8$ e $885,3 \pm 7,0$ e para magnésio variaram de $82,0 \pm 3,5$ e $91,5 \pm 3,7$. Por amostragem direta de suspensão, utilizando 5,0 mL da solução de MEA ($6,0 \text{ mol.L}^{-1}$) + ác. cítrico ($0,20 \text{ mol.L}^{-1}$) e 0,5 mL de leite e analisando as mesmas amostras utilizadas na digestão com emprego do forno de microondas, os valores variaram de $710,0 \pm 6,0$ a $862,1 \pm 6,2$ para o cálcio e de $80,4 \pm 4,5$ a $85,9 \pm 4,9$ para o magnésio. Verificamos que os valores de concentração encontrados para Ca e Mg foram menores para todas as amostras analisadas quando o procedimento convencional foi utilizado.

Tabela 15. Comparação de procedimentos para determinação de cálcio e magnésio em amostras de leite

Amostras de Leite	Convencional (mg .L ⁻¹)		Microondas (mg . L ⁻¹)		Amostragem direta das suspensões (mg . L ⁻¹)	
	Ca	Mg	Ca	Mg	Ca	Mg
Calú	700,0 ± 4,9	65,1 ± 4,9	885,3 ± 7,0	87,0 ± 3,7	862,1 ± 6,2	81,5 ± 4,5
Parmalat	687,5 ± 5,6	61,1 ± 1,9	877,3 ± 7,0	82,0 ± 3,5	734,5 ± 6,0	80,4 ± 4,5
Italac	668,7 ± 6,5	70,9 ± 1,8	864,0 ± 6,9	91,5 ± 3,7	841,4 ± 6,2	85,6 ± 4,9
Centenário	662,5 ± 6,0	60,4 ± 6,7	866,7 ± 6,9	85,0 ± 3,7	848,3 ± 6,2	82,1 ± 4,5
Frutalat	656,2 ± 4,4	62,0 ± 1,3	842,7 ± 6,8	83,1 ± 3,6	710,3 ± 6,0	80,8 ± 4,5
Letícia	693,7 ± 4,1	66,1 ± 2,3	882,7 ± 7,0	85,5 ± 3,7	851,7 ± 6,2	84,3 ± 4,9

Os resultados obtidos nos testes de recuperação com adição de 0,5 mg e 1,0 mg de cálcio e 0,05 mg e 0,10 mg de magnésio, demonstraram a eficiência dos métodos de digestão por solubilização das amostras de leite como é representado pelas tabelas 16 e 17. Exceto os valores de recuperação para o magnésio, empregando o método convencional (recuperação de 80%) todos os valores obtidos empregando os procedimentos utilizados no presente trabalho, apresentaram recuperações adequadas de Ca e Mg.

Tabela 16. Estudos de recuperação para determinação de cálcio em leite.

Amostra	Convencional		Microondas		Amostragem direta das suspensões	
	Encontr.	Recup.	Encontr.	Recup.	Encontr.	Recup.
Am. + 0,50 mg de Ca	0,5	95 %	0,5	98 %	0,5	98 %
Am. + 1,00 mg de Ca	0,93	93 %	1,0	98 %	1,0	98 %

Tabela 17. Estudos de recuperação para determinação de magnésio em leite.

Amostra	Convencional		Microondas		Amostragem direta das suspensões	
	Encontr.	Recup.	Encontr.	Recup.	Encontr.	Recup.
Am. + 0,05 mg de Mg	0,04	80 %	0,05	96 %	0,05	97 %
Am. + 0,10 mg de Mg	0,08	80 %	0,09	90 %	0,10	95 %

Neste trabalho foram executadas algumas comparações, utilizando três técnicas para determinação de Ca e Mg em amostras de leite: a digestão pelo método convencional; a digestão com utilização do forno de microondas e a amostragem direta por suspensões com utilização de uma mistura de aminas + ácido cítrico. Todas as determinações foram realizadas utilizando a técnica de detecção por espectrometria de absorção atômica por chama (DUTRA et al., 2004). A Tabela 18 ilustram os parâmetros de comparação dos procedimentos analíticos propostos no presente trabalho.

Tabela 18- Parâmetros de comparação utilizando os procedimentos analíticos.

Parâmetro	Convencional	Microondas	Amostragem direta das suspensões
Volume de amostra (mL)	20	0,5	0,5
Volume de reagente (mL)	2,5 mL HNO ₃ 1,0 mol.L ⁻¹	2,0mL HNO ₃ (63%) 1,0 mL de H ₂ O ₂ (30% m.v ⁻¹)	5,0 mL de MEA (6,0 mol.L ⁻¹) + ác.cítrico (0,20 mol. L ⁻¹)
Tempo de preparo	18 horas	8,0 min	2,0 min

6. CONCLUSÃO

A diluição do leite com as misturas contendo aminas e ácido cítrico pode ser implementada com a utilização de reagentes comerciais baratos como a monoetanolamina (MEA) e reagentes com elevado teor de pureza como a TRIS (Trishidroximetilaminometano - 99,9%). As avaliações dos respectivos resultados foram positivas, não apresentando contaminações e o tempo para o preparo das amostras foi reduzido, por volta de 2,0 minutos, para amostragem direta das suspensões, e de 8,0 minutos para a digestão em forno de microondas, e para o método convencional foram necessárias 18 horas para o preparo das mesmas amostras.

A digestão em forno de microondas fornece amostras digeridas límpidas de leite, tornando-se um processo eficiente para a determinação dos analitos Ca e Mg. Um dos pontos positivos em relação ao uso do forno de microondas é a possibilidade de utilizar somente ácido nítrico e peróxido de hidrogênio para promover a digestão das amostras de leite.

Os benefícios da análise direta de suspensão incluem: a diminuição do tempo de preparo das amostras, menor possibilidade de contaminação, menor possibilidade de perda do analito devido à retenção de resíduos insolúveis ou volatilização, quantidade reduzida de reagentes, menor produção de resíduos e diminuição dos custos analíticos. Adicionalmente, a análise direta de suspensões por espectrometria de absorção atômica com chama pode ser implementada sem grandes dificuldades para amostras com partículas diminutas (por exemplo: amostras de leite) uma vez que não foi observado o entupimento do capilar que conduz a amostra à câmara de nebulização. No entanto, recomenda-se a aspiração de água pelo capilar após cada amostragem direta da suspensão. A análise direta de suspensões apresenta ainda a vantagem de se utilizar a curva analítica empregando soluções padrão aquosas do analito.

Os procedimentos desenvolvidos podem ser facilmente implementados em análise de rotina, pois os mesmos apresentam vantagens como velocidade analítica, simplicidade, precisão, custo, facilidade de operação e diminuição da probabilidade de contaminação. A escolha do método deve considerar os equipamentos disponíveis no laboratório e a experiência do analista.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOLLINO, O.; ACETO, M.; BRUZZONITI, M.C.; MENTASTI, E. & SARSANINI, C. Speciation of Cu and Mn in milk by solid-phase extraction / ICP – OES. *Anal. Chim. Acta*, 375, 299, 1998.
- ABUSAMRA, A.; MORRIS, J.S.; KOIRTYOHANN, S.R. Wet ashing of some biological samples in a microwave oven. *Anal. Chem.*, 47, 1475, 1975.
- ALEIXO, P.C. *Determinação direta de Fe e Se em leite por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite*. 2000. Dissertação (Mestrado em Química)- Programa de Pós-Graduação em Química, UFSCar, São Carlos, 2000.
- ANKER, P; WIELAND, E.; SIMON, D.; DOHNER, R.E.; ASPER, R.; SIMON, W. Neutral carrier based ion-selective electrode for the determination of total calcium in blood-serum. *Anal. Chem.*, 53, 1974, 1981.
- AZIZ-ALRAHMAN; A.M. Anion exchange separation-atomic absorption spectrophotometric method for the determination of microgram quantities of copper, iron and zinc in infant milk formul: powder form. *Anal. Lett*, 27, 411, 1994.
- BARBOZA, A.C. R. N.; CRUZ, C. V. M. S.; GRAZIANI, M. B.; LORENZETTI, M. C. F.; SABADINI, E. Aquecimento em forno de microondas/ Desenvolvimento de alguns conceitos fundamentais. *Química Nova*, 24, 901, 2001.
- BAUMANN, H. Rapid and sensitive determination of iodine in fresh milk and milk powder by inductively coupled plasma – mass spectrometry (ICP-MS). *Fresenius J. Anal. Chem.* 338, 809, 1990.

- BERMEJO, P.; ALVITE, T.P.; ALONSO, M.C.B. ; BERMEJO, A.; COCHO DE JUAN, J. A. & BERMÚDEZ, J.M.F. Vanadium determination in milk by absorption spectrometry with electrothermal atomisation using hot injection and preconcentration on the graphite tube. *J. Anal. At. Spectrom.* 15, 435, 2000.
- BERTINI, I.; GRAY, H. B.; LIPPARD, S. J.; VALENTINE, J. S. *Bioinorganic Chemistry*, ed. University Science Books, Califórnia, 1994.
- BOCK, R. *A Handbook of decomposition methods in analytical chemistry*. International Texbook, Glasgow, 1999. 444p.
- BRADY, D.V.; MONTALVO, J.G. Direct determination of zinc in sea-bottom sediments by carbon tube atomic-absorption spectrometry. *Anal. Chem. Acta.* 70, 448, 1974.
- BURGUERA, M.; BURGUERA, J.L. Microwave assisted sample decomposition in flow analysis. *Anal. Chim. Acta.* 366, 63, 1998.
- CABRERA, C.; LORENZO, M. L. & LOPEZ, M.C. Lead and cadmium contamination in dairy products and its repercussion on total dietary intake. *J. Agric. Food Chem.* 43, 1605, 1995.
- CARRIÓN, N.; ITRIAGO, A.; MURILLO, M.; ELJURI, E. & FERNÁNDEZ, A. Determination of Ca, K, Mg, Fe, Cu and Zn in maternal milk by ICP-OES. *J. Anal. At. Spectrom.* 9, 205, 1994.
- CHRISTIAN, G. D. *Analytical Chemistry*. 4.ed. Washington: John Wiley & Sons, 1986.
- COELHO, L.M. *Decomposição em linha de amostras de interesse clínico com emprego de forno de microondas e sistema em fluxo*. 2000. 79 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, 2000.

- CONI, E.; STACCHINI, A.; CAROLI, S. & FALCONIERI, P. Analytical approach to obtaining reference values for minor and trace elements in human milk. *J. Anal. At. Spectrom.* 5, 581, 1990.
- COSTA, E.O. Projeto temático FAPESP- Trabalho de base - veterinária- *Revista FAPESP*, 42, p.14, 1999
- DE LA FUENTE, M.A. & JUÁREZ, M. Determination of phosphorus in dairy products by sample wet digestion in a microwave oven. *Anal. Chim. Acta*, 309, 355, 1995a.
- DE LA FUENTE, M.A. & JUÁREZ, M. Rapid determination of Ca, Mg, Na and K in milk by flame atomic spectrometry after microwave oven digestion. *Analyst*. 120, 107, 1995b.
- DE LA FUENTE, M.A. ; CARAZO, B. & JUÁREZ, M. Determination of major minerals in dairy products digested in closed vessels using microwave heating. *J. Dairy Scien.* 80, 806, 1997.
- DUTRA, M.J.A.; SANTOS, D.M. & COELHO, N.M.M. Comparação de procedimentos analíticos para preparo de amostras para determinação de cálcio e magnésio em leite. *Anal.* 3, 36, 2004.
- EVANS, S. & KRÄHENBÜHL, U. Boron analysis in biological material: microwave digestion procedure and determination by different methods. *Fresenius J. Anal. Chem.* 349, 454, 1994.
- FARIA, V. P. & MATTOS, W.R.S. Leite informal: um inimigo invisível. *Balde Branco*. 60, 5, 1999
- FOOD AND NUTRITION BOARD. *National Research Council National Academy of Sciences*, 8.ed. rev., 2001.

- GÉLINAS, Y.; IYENGAR, G. & BARNES, R.M. Total iodine in nutritional and biological reference materials using neutron activation analysis na inductively coupled plasma mass spectrometry, *Fresenius J. Anal. Chem.* 362, 483, 1998.
- GREWOOD, N. N.; & EARSHWAW, A. *Chemistry of the elements*. 2.ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1997.
- GUMARÃES, P.; Valor nutritivo do leite. *Ciência do leite*. 5, 68, 2003.
- HAPPER, H.A.; RODWELL, V.W.; MAYES, P.A. *Manual de química fisiológica*. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 1982.
- HUA, K.M.; KAY, M. & INDYK, H.E. Nutritional element analysis in infant formulas by direct dispersion and inductively coupled plasma – optical emission spectrometry (ICP-OES). *Food Chem.* 68, 463, 2000.
- HULANICKI, A.; LEWANDOWSKI, R.; MICHALSKA, A.; LEWENSTAM, A. Potentiometric method for the determination of calcium in blood-serum. *Anal. Chim. Acta.* 233, 269, 1990.
- IKEM, A.; NWANKWOALA, A.; ODUEYUNGBO, S.; NYAVOR, K. & EGIEBOR, N. Levels of 26 elements in infant formula from USA, UK and Nigeria by microwave digestion and ICP-OES. *Food Chem.* 77, 439, 2002.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. 21.ed. 1998. 459p.
- IYENGAR, G.V.; SUBRAMANIAN, K.S.; WOITTIEZ, J.R.W. *Elemental analysis of biological samples, principles and practice*, ed. CRC Press, 1998.
- JENSEN, R. G. *Handbook of mik composition*. New York: Academic Press, 1995.

- KARANASSIOS, V.; LI, F.H.; LIU, B.; SALIN, E.D. Rapide stopped-flow microwave digestion system. *J. Anal. At. Spectrom.* 6, 457, 1991.
- KAIM, W.; SCHWERDERSKI, B. *Bioinorganic chemistry: inorganic elements in the chemistry of life*. New York: John Wiley & Sons, 1994. 401p.
- KINGSTON, H.M.; JASSIE, L.B. Introduction to microwave sample preparation, theory and practice. *American Chemical Society*, 1988. 263p.
- KNAPP, G.; MAICHIN, B.; FECHER, P.; HASSE, S. & SCHRAMEL, P. Iodine determination in biological materials. Options for sample preparation and final determination. *Fresenius. J. Anal. Chem.* 362, 508, 1998.
- KRUSHEVSKA, A.; BARNES, R.M. & AMARASIRIWARADENA, C.J. Decomposition of biological samples for ICP-OES using an open focused microwave digestion system. *Anal.* 118, 1175, 1993.
- LAMEIRAS, J.; SOARES, M.E.; BASTOS, M.L. & FERREIRA, M. Quantification of total chromium and hexavalent chromium in UHT milk by ETAAS. *Anal.* 123, 2091, 1998.
- LARSEN, E.H. & LUDWIGSEN, M.B. Determination of iodine in food-related certified reference materials using wet ashing and detection by inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* 12, 435, 1997.
- MAGALHÃES, C. E. C.; ARRUDA, M. A. Z.; Amostragem de suspensões: emprego da técnica na análise direta de amostras. *Química Nova*, 21, 459, 1998.
- MAPA. *Instrução Normativa nº 51 de 18/09/2002*. Brasília; MAPA, 2002.
- MANZONI, A. ; PREMOLI, P. Methodology and Clinical Applications of Ion-Selective Electrodes. *Copenhage*, 1985.

- McCAROLL, N.A. Quantitative Analysis of Calcium and Magnesium. *Anal. Chem.* 65, 388, 1993.
- McKINSTRY, P.J.; INDYK, H.E. & KIM, N.D. The determination of major and minor elements in milk and infant formula by slurry nebulisation and inductively coupled plasma – optical emission spectrometry (ICP-OES). *Food Chem.* 65, 245, 1999.
- MINGORANCE, M. D.; PÉREZ-VAZQUEZ, M.L.; LACHICA, M. Microwave digestion methods for the atomic spectrometric determination of some elements in biological samples. *J. Anal. At. Spectrom.* 8, 853, 1993.
- NÓBREGA, J.A.; GÉLINAS, Y.; KRUSHEVSKA, A. & BARNES, R.M. Direct determination of major and trace elements in milk by ICP-OES and ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* 12, 1243, 1997.
- RÄDLINGER, G. & HEUMANN, K. G. Iodine determination in food samples using inductively coupled plasma isotope dilution mass spectrometry. *Anal. Chem.* 70, 2221, 1998.
- SANTOS, D.M.; NOGUEIRA, A.R.A.; NEVES, E.F.A.; CAVALHEIRO, E.T.G.; NÓBREGA, J.A. Análise química inorgânica de leite estimulação do reagente CFA-C. *Eclet. Quím.* 27, 61, 2002.
- SANTOS, D.M. Avaliação de procedimentos para preparo de amostras de leite visando determinação elementar por ICP-OES com visão axial. 2002. Tese (Doutorado em Química)- Universidade Federal de São Carlos, USFCar, São Carlos, 2002.
- SCHRAMMEL, P. & HASSE, S. Destruction of organic materials by pressurized microwave digestion. *Fresenius. J. Anal. Chem.* 346, 794, 1993.
- SCHRAMMEL, P. & HASSE, S. Iodine determination in biological materials by ICP-MS. *Mikrochim. Acta.* 116, 205, 1994.

- SEILER, H.G.; SIGEL, H.; SIGEL, A. *Handbook on toxicity of inorganic compounds*. New York: Marcel Dekker Inc, 1988.
- SILVA, F.V.; LOPES, G.S.; NÓBREGA, J.A.; SOUZA, G.B. & NOGUEIRA, A.R.A. Study of the protein-bound fraction of calcium, iron, magnesium and zinc in bovine milk. *Spectrochim. Acta*. 56, 1909, 2001.
- SILVESTRE, M.D. ; LAGARDA, M.J.; FARRÉ, R.; MARTÍNEZ-COSTA, C. & BRINES, J. Copper, iron and zinc determinations in human milk using FAAS with microwave digestion. *Food Chem*. 68, 95, 2000.
- STÜRUP, S. & BÜCHERT, A. Direct determination of copper and iodine in milk and milk powder in alkaline solution by flow injection inductively coupled plasma mass spectrometry. *Fresenius J. Anal. Chem*. 354, 323, 1996.
- SULCEK, Z.; POVONDRA, P. *Methods of decomposition on in inorganic analysis*. CRC Press, Boca Raton. Flórida. 1989. 325p.
- TORRES, R.M.; NAVARRO, M.; LÓPEZ-RUIZ, M.D.; ARTACHO, R.; LOPEZ, C. A mineralization procedure for determining magnesium in milk. *Lebensn-Wiss u- Technol*. 33, 397, 2000
- WAPPELHORST, O.; KÜHN, I., HEIDENREICH, H. & MARKERT, B. Transfer of selected elements from food into human milk. *Nutr*. 18, 316, 2002.
- WILLIS, J.B. The early of atomic absorption spectrometry in clininal chemistry. *Spectrochim. Acta*. 54, 1971, 1999.
- ZLOTORYNSKI, A. Introduction to microwave sample preparation theory an practices. *Crit. Rev. Anal. Chem*. 25; 43, 1995.