



**AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO**

**ESTUDO DA COMPOSIÇÃO MINERAL E DOS ELEMENTOS-
TRAÇO ESSENCIAIS EM AMOSTRAS DE LEITE E
PRODUTOS LÁCTEOS POR ESPECTROMETRIA DE
EMISSÃO ATÔMICA COM PLASMA INDUZIDO E
ANÁLISE POR ATIVAÇÃO COM NÊUTRONS**

CARMEN SILVIA KIRA

**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear - Aplicações.**

**Orientadora:
Dra. Vera Akiko Maihara**

**São Paulo
2002**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

ESTUDO DA COMPOSIÇÃO MINERAL E DOS ELEMENTOS-TRAÇO ESSENCIAIS
EM AMOSTRAS DE LEITE E PRODUTOS LÁCTEOS POR ESPECTROMETRIA DE
EMISSÃO ATÔMICA COM PLASMA INDUZIDO E ANÁLISE POR ATIVAÇÃO
COM NÊUTRONS

CARMEN SILVIA KIRA



Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do
Grau de Mestre em Ciências na
Area de Tecnologia Nuclear –
Aplicações

Orientador(a):

Dra. Vera Akiko Maihara

SÃO PAULO

2002

AGRADECIMENTOS

À Dra. Vera Akiko Maihara meus sinceros agradecimentos pela orientação e interesse, que muito contribuíram para a realização deste trabalho, além da compreensão e amizade demonstradas durante este período;

À Direção do Instituto Adolfo Lutz, especialmente ao Dr. Odair Zenebon, Diretor da Divisão de Bromatologia e Química, e ao Dr. Paulo Tiglea, Diretor do Serviço de Química Aplicada pelo consentimento para a realização deste trabalho;

À Alice Sakuma, chefe da Seção de Equipamentos Especializados, pela possibilidade de desenvolver este trabalho e pelos conselhos dados;

Ao pessoal da Seção de Equipamentos Especializados do Instituto Adolfo Lutz, principalmente à Franca, Fátima, Isaura e Cristina pelo constante incentivo e apoio recebidos;

Aos estagiários da Seção de Equipamentos Especializados: Gisele, Luís, Carolina e Patrícia que me ajudaram na parte experimental deste trabalho;

A todos os integrantes do Laboratório de Análise por Ativação Neutrônica do IPEN-CNEN/SP pelo convívio durante este período;

Aos meus pais, que sempre me incentivaram e torceram por mim.

ESTUDO DA COMPOSIÇÃO MINERAL E DOS ELEMENTOS-TRAÇO ESSENCIAIS
EM AMOSTRAS DE LEITE E PRODUTOS LÁCTEOS POR ESPECTROMETRIA DE
EMIÇÃO ATÔMICA COM PLASMA INDUZIDO E ANÁLISE POR ATIVAÇÃO
COM NÊUTRONS

Carmen Silvia Kira

RESUMO

A composição dos alimentos tanto do ponto de vista nutricional como toxicológico tem sido enfocada nos últimos anos. Alguns elementos químicos são necessários para o metabolismo das células, enquanto que o seu excesso ou deficiência pode ser responsável por alguns problemas característicos. Um dos mais importantes alimentos para a nutrição humana é o leite. Durante os primeiros meses de vida, as necessidades nutricionais de crianças são satisfeitas com leite e produtos lácteos, que fornecem os principais elementos necessários para o crescimento de diferentes tecidos, bem como para o funcionamento de vários sistemas enzimáticos. As deficiências minerais durante este período podem interferir com o desenvolvimento das crianças. A determinação de minerais e elementos traço por técnicas espectroscópicas normalmente envolve um pré-tratamento da amostra. Esta é a etapa mais crítica da análise devido ao tempo gasto, às possíveis contaminações e à perda dos analitos associada a este passo. Foram avaliados diferentes procedimentos de preparo de amostra (digestão por via seca, digestão por via úmida em chapa elétrica e em forno de microondas) para a análise de Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn em amostras de leite e derivados pela técnica de ICP OES. Neste trabalho os resultados obtidos através da técnica de ICP OES após os diferentes tratamentos de amostra foram comparados com os obtidos pela técnica de AANI, que não requer dissolução da amostra. A digestão parcial com ácido clorídrico diluído para amostras de leite e produtos lácteos mostrou-se adequada para a determinação de Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn com boa exatidão e repetibilidade.

STUDY OF MINERAL AND ESSENTIAL TRACE ELEMENTS IN MILK AND DAIRY
PRODUCTS BY INDUCTIVELY COUPLED PLASMA ATOMIC EMISSION
SPECTROMETRY AND NEUTRON ACTIVATION ANALYSIS

Carmen Silvia Kira

ABSTRACT

The importance of food composition related to nutritional and toxicological contents has been emphasized in recent years. Some chemical elements are needed for cell metabolism, while excess or deficiency may be responsible for disorders. Milk is considered the most important food during the first months of life, nutritional needs of children being satisfied by milk and dairy products. These foods provide the main trace elements for the good growth of different tissues as well as the functioning of several enzymatic systems. Important deficiencies in mineral during this period can interfere with children's development. Determination of mineral and trace elements by using spectroscopic techniques generally involves a pretreatment of sample. Sample preparation is the most critical part of the analysis because of the long preparation time and the possibilities for contamination and losses of the analyte associated with this step. Different procedures of sample preparation (dry ashing digestion, wet digestion using an open focused microwave and a hot plate) were evaluated for determining Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P and Zn in milk and dairy products by the ICP OES technique. In this work the concentrations obtained for the elements determined by the ICP OES technique after using the different treatments of sample were compared to the results obtained by the INAA technique, that does not require dissolution of sample. The partial digestion with diluted hydrochloric acid was found to be suitable for determining Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P and Zn in milk samples and dairy products.

SUMÁRIO

	Página
1	INTRODUÇÃO 1
1.1	Considerações gerais 1
1.2	Objetivos 5
1.3	Relevância do trabalho 5
1.4	Técnicas analíticas utilizadas 6
1.4.1	Espectrometria de emissão atômica por plasma de argônio acoplado indutivamente (ICP OES) 6
1.4.1.1	Interferências em ICP OES 8
1.4.1.1.1	Interferências espectrais 9
1.4.1.1.2	Interferência de radiação de fundo..... 9
1.4.1.1.3	Interferência de matriz 9
1.4.2	Análise por ativação com nêutrons instrumental (AANI) 9
1.4.2.1	Características da AANI 10
1.4.2.2	Ativação 11
1.4.2.3	Medida 12
1.4.2.4	Análise do espectro de raios gama 13
2	CONSIDERAÇÕES SOBRE AS TÉCNICAS DE DISSOLUÇÃO DE AMOSTRA DE ALIMENTOS 14
2.1	Definições 14
2.2	Destrução da matéria orgânica 14
2.2.1	Digestão via seca 15
2.2.2	Digestão via úmida 17
2.2.3	Digestão via úmida por microondas 20
2.2.4	Outros métodos de tratamento de amostra 23
3	PARTE EXPERIMENTAL 26
3.1	Amostras 26

3.2	Análise por ativação com nêutrons – AANI	26
3.2.1	Preparação das amostras de leite em pó e dos produtos lácteos para irradiação	26
3.2.2	Preparação dos materiais de referência para irradiação.....	27
3.2.3	Padrões utilizados na AANI	27
3.2.4	Irradiação das amostras e padrões	27
3.2.4.1	Determinação dos elementos sódio, potássio, manganês, magnésio e cálcio	27
3.2.4.2	Determinação dos elementos cálcio, ferro e zinco.....	28
3.2.5	Medidas das atividades das amostras e padrões	28
3.2.6	Cálculo das concentrações	29
3.3	ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ATÔMICA POR PLASMA DE ARGÔNIO ACOPLADO INDUTIVAMENTE – ICP OES.....	29
3.3.1	Padrões utilizados em ICP OES	29
3.3.2	Condições experimentais para ICP OES	30
3.3.3	Critérios para escolha dos comprimentos de onda para os elementos analisados por ICP OES	31
3.3.4	Critérios para a escolha do procedimento de digestão da amostra	31
3.4	DIGESTÃO POR VIA SECA	32
3.4.1	Amostras de leite em pó	32
3.4.2	Amostras de queijo liofilizadas (minas, mussarela, prato e parmesão) .	32
3.4.3	Amostra de achocolatado	32
3.4.4	Amostra de iogurte	33
3.4.5	Amostra de queijo petit suisse	33
3.4.6	Amostras de queijo mussarela e parmesão <i>in natura</i>	33
3.5	DIGESTÃO VIA ÚMIDA	33
3.5.1	Critérios para escolha do reagente a ser utilizado na digestão via úmida	33
3.5.2	Digestão por via úmida em chapa elétrica	33
3.5.2.1	Amostras de leite em pó (integral e desnatado)	33
3.5.2.2	Amostras de queijos liofilizados (minas, mussarela, prato e parmesão)	34

3.5.2.3	Amostra de achocolatado	34
3.5.2.4	Amostra de iogurte	34
3.5.2.5	Amostra de queijo petit suisse	34
3.5.2.6	Amostras de queijo mussarela e parmesão in natura	34
3.5.3	Estudo da concentração do ácido na solução digerida por via úmida em chapa elétrica	35
3.5.4	Digestão por via úmida com forno de microondas focalizado	35
3.5.5	Análise dos materiais de referência certificados	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1	Análise de amostras de leite em pó	38
4.2	Análise dos materiais de referência certificados	42
4.3	Análise dos produtos lácteos	47
4.4	Aplicação do método de digestão via úmida com ácido clorídrico em amostra de queijo in natura	52
4.5	Estudo da variação na concentração de ácido na solução digerida por via úmida em chapa	54
4.6	Determinação dos limites de detecção e quantificação	57
5	CONCLUSÕES	60
	ANEXO A: Análise estatística utilizada na avaliação dos resultados ..	61
	APÊNDICE A: Valores de t e q calculados para as comparações de médias e valores de t crítico e q crítico para o teste t e teste de Tukey-Kramer, respectivamente	66
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 3.1	Dados dos padrões sintéticos utilizados na AANI 27
Tabela 3.2	Concentração dos padrões multi-elementares para o estabelecimento da curva de calibração (em mg L ⁻¹) 30
Tabela 3.3	Parâmetros Instrumentais do ICP OES 30
Tabela 3.4	Condições de trabalho no ICP OES 31
Tabela 3.5	Programa aplicado ao forno de microondas para digestão de leite em pó integral (LI1) 36
Tabela 3.6	Programa aplicado ao forno de microondas para digestão de leite em pó integral (LI2) 36
Tabela 3.7	Programa aplicado ao forno de microondas para digestão de leite em pó desnatado (LD1) 36
Tabela 3.8	Programa aplicado ao forno de microondas para digestão de leite em pó desnatado (LD2) 36
Tabela 4.1	Resultados dos elementos determinados em leite em pó integral por AANI e por ICP OES, pelos vários métodos de digestão (em mg kg ⁻¹) 38
Tabela 4.2	Resultados dos elementos determinados em leite em pó desnatado por AANI e ICP OES, pelos vários métodos de digestão (em mg kg ⁻¹) 39
Tabela 4.3	Comparação entre as médias obtidas para a amostra de leite em pó integral pela técnica de AANI e ICP OES após os diferentes métodos de digestão, aplicando o teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer 40
Tabela 4.4	Comparação entre as médias obtidas para a amostra de leite em pó desnatado pela técnica de AANI e ICP OES após os diferentes métodos de digestão, aplicando o teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer 40

Tabela 4.5	Resultados dos elementos determinados em NIST 8435 por ICP OES, pelos vários métodos de digestão e por AANI (em mg kg ⁻¹) ...	43
Tabela 4.6	Comparação entre as médias obtidas para o material de referência certificado NIST 8435 por ICP OES, pelos diferentes métodos de digestão e a técnica de AANI aplicando o teste de Dunnett	43
Tabela 4.7	Resultados dos elementos determinados em NIST1549 por ICP OES, pelos vários métodos de digestão e por AANI (em mg kg ⁻¹) ..	44
Tabela 4.8	Comparação entre as médias obtidas para o material de referência certificado NIST 1549 pela técnica de AANI e ICP OES, aplicando o teste de Dunnett	44
Tabela 4.9	Resultados dos elementos determinados em amostras de queijo mussarela e minas por AANI e por ICP OES, pelos métodos de digestão por via seca e via úmida em chapa elétrica (em mg kg ⁻¹) ...	47
Tabela 4.10	Comparação entre as médias obtidas para as amostras de queijo mussarela e minas pela técnica de AANI e ICP OES, com diferentes métodos de digestão, aplicando o teste de Tukey-Kramer	48
Tabela 4.11	Resultados dos elementos determinados em amostras de queijo prato e parmesão por AANI e por ICP OES, pelos métodos de digestão por via seca e úmida em chapa elétrica (em mg kg ⁻¹)	48
Tabela 4.12	Comparação entre as médias obtidas para as amostras de queijo prato e parmesão pela técnica de AANI e ICP OES, com diferentes métodos de digestão, aplicando o teste de Tukey-Kramer	49
Tabela 4.13	Resultados e comparação das médias obtidas para os elementos determinados na amostra de queijo petit suisse por AANI e por ICP OES (digestão por via seca e úmida em chapa elétrica) (em mg kg ⁻¹)	49
Tabela 4.14	Resultados dos elementos determinados em amostras de achocolatado e iogurte por AANI e por ICP OES, pelos métodos de digestão por via seca e úmida em chapa elétrica (em mg kg ⁻¹)	51
Tabela 4.15	Comparação entre as médias obtidas para as amostras de achocolatado e iogurte pela técnica de AANI e pelos diferentes	

	métodos de digestão determinados por ICP OES aplicando o Teste de Tukey-Kramer	52
Tabela 4.16	Resultados e comparações das médias obtidas para os elementos determinados por ICP OES em queijo parmesão in natura após as digestões via seca e via úmida em chapa elétrica (em mg kg ⁻¹)	53
Tabela 4.17	Resultados e comparação das médias obtidas para os elementos determinados por ICP OES em queijo mussarela in natura após as digestões via seca e via úmida em chapa elétrica (em mg kg ⁻¹)	53
Tabela 4.18	Resultados dos elementos determinados por digestão via úmida em chapa antes e após o teste da variação de concentração do ácido na solução do digerido	55
Tabela 4.19	Comparação das médias obtidas para as amostras de achocolatado, iogurte e queijo petit suisse determinados por ICP OES, após a digestão via úmida em chapa elétrica e para a solução digerida que depois foi levada à secura e avolumada no mesmo meio ácido da curva de calibração	55
Tabela 4.20	Resultados dos elementos determinados por digestão via úmida em chapa elétrica antes e após o teste da variação de concentração de ácido na solução digerida com ácido clorídrico	56
Tabela 4.21	Comparação das médias obtidas pelo teste de Tukey-Kramer para as amostras de queijo parmesão e mussarela in natura, determinados por ICP OES, após a digestão via úmida em chapa elétrica e para esta solução que foi levada à secura e avolumada no mesmo meio ácido da curva de calibração	56
Tabela 4.22	Limites de detecção e quantificação para os elementos determinados por ICP OES nas linhas escolhidas	58
Tabela 4.23	Limites de detecção e quantificação determinados em amostras de leite em pó integral e queijo mussarela pela técnica de AANI	59

	métodos de digestão determinados por ICP OES aplicando o Teste de Tukey-Kramer	52
Tabela 4.16	Resultados e comparações das médias obtidas para os elementos determinados por ICP OES em queijo parmesão in natura após as digestões via seca e via úmida em chapa elétrica (em mg kg ⁻¹)	53
Tabela 4.17	Resultados e comparação das médias obtidas para os elementos determinados por ICP OES em queijo mussarela in natura após as digestões via seca e via úmida em chapa elétrica (em mg kg ⁻¹)	53
Tabela 4.18	Resultados dos elementos determinados por digestão via úmida em chapa antes e após o teste da variação de concentração do ácido na solução do digerido	55
Tabela 4.19	Comparação das médias obtidas para as amostras de achocolatado, iogurte e queijo petit suisse determinados por ICP OES, após a digestão via úmida em chapa elétrica e para a solução digerida que depois foi levada à secura e avolumada no mesmo meio ácido da curva de calibração	55
Tabela 4.20	Resultados dos elementos determinados por digestão via úmida em chapa elétrica antes e após o teste da variação de concentração de ácido na solução digerida com ácido clorídrico	56
Tabela 4.21	Comparação das médias obtidas pelo teste de Tukey-Kramer para as amostras de queijo parmesão e mussarela in natura, determinados por ICP OES, após a digestão via úmida em chapa elétrica e para esta solução que foi levada à secura e avolumada no mesmo meio ácido da curva de calibração	56
Tabela 4.22	Limites de detecção e quantificação para os elementos determinados por ICP OES nas linhas escolhidas	58
Tabela 4.23	Limites de detecção e quantificação determinados em amostras de leite em pó integral e queijo mussarela pela técnica de AANI	59

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1.1 Representação das diferentes regiões da descarga do plasma do ICP	7
FIGURA 1.2 Representação do processo de emissão no plasma	8
FIGURA 1.3 Representação para o processo de captura de um nêutron por um núcleo alvo seguido pela emissão de raios gama	12
FIGURA 4.1 Z-score para NIST 8435 Whole Milk Powder determinado para os diferentes métodos de digestão de amostra por ICP OES e AANI	45
FIGURA 4.2 Z-score para NIST 1549 Non Fat Milk Powder determinado por ICP OES e AANI	46

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1 – Considerações gerais

A importância dos alimentos e de uma dieta equilibrada na saúde dos homens tem sido enfatizada nos últimos tempos. Cada vez mais a população, de um modo geral, tem-se preocupado com a qualidade dos alimentos consumidos, tanto em relação ao seu aspecto nutricional quanto aos possíveis efeitos que possam afetar diretamente a qualidade de vida.

O corpo humano necessita de uma série de substâncias para a manutenção do equilíbrio de todas as suas funções vitais. Dentre estas substâncias estão as vitaminas e os minerais que embora representem uma porcentagem muito pequena do peso corporal total desempenham papéis importantes nos diferentes processos metabólicos e enzimáticos (ONG, 1992; TOLONEN, 1995).

O principal papel do sódio é regular a pressão osmótica; o potássio além de desempenhar esse papel de regular a pressão osmótica, atua também na atividade muscular e no metabolismo de carboidratos; o cálcio e o fósforo contribuem para a formação dos ossos e dentes; o manganês age como parte essencial das enzimas celulares que catalisam reações metabólicas importantes; o cromo está associado com o metabolismo da glicose; o cobre está associado à produção de energia, o zinco é constituinte de enzimas celulares; o ferro está associado à síntese da hemoglobina; o magnésio age como ativador de enzimas para a produção de energia e de proteínas construtoras dos tecidos; o selênio faz parte da enzima glutationa-peroxidase, que tem a função de proteger as membranas celulares eliminando os radicais peróxidos do organismo (LINDER, 1991).

As conseqüências das deficiências minerais são as mais variadas. Por exemplo, a falta de cálcio provoca retardamento no crescimento, fragilidade dos ossos, susceptibilidade às cáries dentárias e osteoporose; a carência de zinco também provoca baixo crescimento, deficiência de imunidade, estresse; a deficiência de ferro provoca anemia, dificuldade de

aprendizagem, diminuição da capacidade de trabalho e afeta também o quociente de inteligência em crianças (WILLIAMS, 1997).

Durante os primeiros anos de vida as necessidades nutricionais das crianças são parcialmente supridas pelo consumo de leite e de produtos lácteos. Esses alimentos fornecem alguns dos principais elementos essenciais que são necessários para o crescimento saudável de diferentes tecidos, assim como, o funcionamento de muitos sistemas enzimáticos (BIEGO, 1998).

O leite é um alimento especialmente importante durante as fases de crescimento e em situações fisiológicas específicas, como a gestação e lactância, devido ao alto valor nutritivo em proteínas, vitaminas, cálcio, dentre outros nutrientes. A grande oferta atual de produtos lácteos permite substituir o leite por seus derivados com iguais benefícios nutricionais e maiores vantagens de aceitação. Assim, pessoas que não podiam consumir leite ou seus derivados devido a um componente específico, dispõem hoje em dia de produtos especiais obtidos mediante diversas modificações do leite, que mantém o valor nutricional do lácteo, porém adaptando-o às necessidades distintas. Atualmente existem no mercado produtos lácteos enriquecidos e/ou modificados para atender às necessidades nutricionais de um grupo diferenciado, como no caso de crianças e idosos. Um exemplo disso é a substituição do leite de vaca in natura pelo leite enriquecido com ferro. O leite de vaca in natura, não modificado, possui baixo teor de ferro e um elevado teor de cálcio e fósforo, o que inibe a absorção de ferro, causando quadros de deficiência desse mineral (WILLIAMS, 1997).

A Portaria 31 de 13/01/98 do Ministério da Saúde institui critérios para a adição de nutrientes essenciais em alimentos, dentre eles destacando-se o uso de alimentos enriquecidos ou fortificados para programas institucionais.

Esta Portaria define como nutriente essencial toda substância normalmente consumida para o crescimento, desenvolvimento e manutenção da saúde e que não é sintetizada pelo organismo ou é sintetizada, porém em quantidade insuficiente.

Sendo o leite um dos alimentos de origem animal mais importante devido ao seu grande consumo por parte da população, uma das propostas do Governo é o de consolidar ações de combate às carências nutricionais a fim de prevenir ou atenuar a ocorrência ou agravamento de doenças causadas pela desnutrição, através do Projeto Estadual do Leite "Viva Leite" instituído pelo Decreto nº 44569 de 22/12/99. Este projeto é destinado ao

atendimento às crianças carentes de seis meses até seis anos de idade do Estado de São Paulo, mediante a distribuição gratuita de leite fluído pasteurizado, com teor de gordura mínimo de três por cento, e enriquecido com ferro e vitaminas A e D. Para garantir a qualidade deste leite, laboratórios, como o Instituto Adolfo Lutz, estão colaborando na monitorização da composição de ferro, vitamina A dentre outros, a fim de que as autoridades competentes possam atuar junto às empresas fornecedoras no sentido de manter os níveis de ferro dentro do parâmetro estabelecido, que é de $6,0 \text{ mg L}^{-1}$. Portanto, é importante que se disponha de um método capaz de analisar a composição de metais no leite de forma mais ágil.

A composição mineral do leite varia com o tipo de gado, a alimentação a que estão sujeitos os animais, por exemplo, o tipo de pastagem, que varia com a composição do solo e a época do ano (FORD, 1986; ROJAS, 1994; CONI, 1995).

Muitas técnicas analíticas espectroscópicas como a espectrometria de emissão atômica com plasma de argônio acoplado indutivamente (ICP OES) têm sido largamente utilizadas na determinação de minerais e elementos traço em leite, pois se conseguem baixos limites de detecção, faixa linear de trabalho ampla e a possibilidade de se fazer determinações simultâneas multi-elementares (SUDDENDORF, 1984; FAGIOLI, 1990; CONI, 1994; BRATTER, 1995a; MCKINSTRY, 1999; BORKOWSKA-BURNECKA, 2000).

Para a maioria das técnicas analíticas, como a espectrometria de absorção atômica (AAS), espectrometria de emissão atômica por plasma de argônio acoplado indutivamente (ICP OES), voltametria de redissolução anódica, potenciometria, espectrofotometria, a amostra necessita de uma preparação prévia para que possa ser submetida à leitura no equipamento. Optando por estas técnicas de detecção para elementos-traço, a dissolução da matriz é o estágio vital para sua determinação. A extensão da dissolução dos componentes da amostra original depende da técnica analítica usada. Assim, a presença de teores de matéria orgânica não totalmente dissolvida podem ser tolerados quando a solução resultante é analisada por métodos como ICP OES ou espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS), o que pode não ocorrer na técnica voltamétrica (DUNEMANN, 1992; MINGORANCE, 1993; NOVOZAMSKY, 1995; SUBRAMANIAN, 1996; KARADJOVA, 2000).

A análise por ativação com nêutrons instrumental (AANI) tem sido muito utilizada para a análise de alimentos e matrizes biológicas, uma vez que apresenta grande sensibilidade

e exatidão para a maioria dos elementos de interesse nutricional e toxicológico, possuindo uma característica única entre os métodos de análise de traço, que é a de não necessitar da análise de um branco analítico, pois uma vez irradiada com nêutrons a amostra produz isótopos radioativos os quais são distinguidos dos não radioativos, por medidas em espectrômetros de raios gama (KANIAS, 1999).

A técnica também tem sido utilizada para a certificação de elementos na faixa de $\mu\text{g g}^{-1}$ a ng g^{-1} em materiais de referência certificados (BECKER, 1992). Esta técnica analítica vem desempenhando um papel importante na monitorização de elementos traço em diversos alimentos, e tem contribuído significativamente para estabelecer valores de ingestão diária de muitos elementos essenciais (IYENGAR, 1994; KANIAS, 1999; DANG, 2001; GHARIB, 2001).

Alimentos diversos como carnes, peixes, leite e dietas variadas foram analisados por AANI, demonstrando a aplicabilidade do método para a determinação dos constituintes inorgânicos nos vários tipos de alimentos em toda a faixa de concentração de interesse prático (LAVI, 1990; ANDERSON, 2001; FUKUSHIMA, 2001; MAIHARA, 1995; MAIHARA, 1998; MAIHARA, 2001).

Como a AANI não requer destruição da matéria orgânica, o que simplifica a análise e minimiza o risco de contaminação, geralmente esta técnica analítica é escolhida como técnica comparativa para verificar o conteúdo de elementos em diferentes matrizes biológicas, geológicas, ambientais e/ou alimentos (BRATTER, 1995b; ZIKOVSKY, 2001).

Para a determinação de metais nos alimentos por ICP OES é necessário que eles estejam livres e em solução aquosa. Isto pode ser obtido através dos processos de destruição da matéria orgânica.

Há dificuldades na escolha de um procedimento de dissolução de amostra devido às possíveis contaminações da amostra e/ou perdas dos analitos associadas a este passo, sendo por esse motivo, a destruição da matéria orgânica considerada pela maioria dos analistas, como a etapa crítica de técnicas que necessitam ou envolvam um pré-tratamento de amostra (HOENING, 1996). Assim, há necessidade em se estudar métodos alternativos de pré-tratamento de amostra de leite aos empregados tradicionalmente, como a digestão completa por via seca e por via úmida que podem levar até alguns dias.

A aplicação de um procedimento de tratamento de amostra rápido e simples poderá ser utilizada em análises de rotina de um laboratório, aumentando sua produtividade.

Neste trabalho foram comparados diferentes métodos de tratamento de amostra de leite, como digestão por via seca, digestão via úmida realizada em chapa elétrica, digestão via úmida realizada em forno de microondas focalizado com posterior determinação por ICP OES e a técnica de análise por ativação com nêutrons instrumental, a qual não necessita de um pré-tratamento de amostra para a determinação dos seguintes elementos: Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn em amostras de leite.

1.2 Objetivos

- a) Avaliar diferentes procedimentos de dissolução (digestão via úmida utilizando-se forno de microondas focalizado, via úmida utilizando chapa elétrica e via seca) para análise de minerais e elementos-traço essenciais em leite;
- b) Empregar as técnicas de espectrometria de emissão atômica com plasma de argônio acoplado indutivamente (ICP OES) e análise por ativação com nêutrons instrumental (AANI) para a determinação dos seguintes elementos: Ca, Cr, Cu, K, Fe, Mg, Mn, Na, P e Zn.
- c) Aplicar o método de dissolução escolhido (dentre os diferentes métodos de tratamento de amostra de leite estudados) para análise de minerais e elementos traço em produtos lácteos.

1.3 Relevância do trabalho

A importância deste trabalho para a saúde pública deve-se ao fato do leite ser um dos principais alimentos consumidos principalmente por bebês e crianças nos primeiros anos de vida, sendo por isso utilizado em programas do Governo no combate às carências nutricionais (especificamente no combate às carências de ferro). Dessa maneira, torna-se fundamental o desenvolvimento de metodologias rápidas que permitam verificar a qualidade da composição mineral desse alimento e de seus derivados, contribuindo, portanto para a melhoria da qualidade do leite fornecido nos programas institucionais, pois com a utilização de um método rápido, uma maior quantidade de amostra poderá ser monitorizada.

1.4 Técnicas analíticas utilizadas

1.4.1 Espectrometria de emissão atômica por plasma de argônio acoplado indutivamente (ICP OES)

A espectroscopia de emissão atômica é um processo no qual a luz emitida por átomos excitados ou íons é medida. A emissão ocorre quando energia térmica ou elétrica excita um átomo livre ou íon a ponto de levá-lo a um estado energético mais alto, sendo este estado instável. A luz é emitida no retorno à condição mais estável ou ao estado fundamental dos mesmos. Os comprimentos de onda emitidos são específicos para os elementos que estão presentes na amostra.

No caso da técnica de ICP OES o plasma é usado como fonte de excitação para análise quantitativa de amostras líquidas e mais recentemente de amostras sólidas (utilizando um compartimento de amostra inserido diretamente no centro do plasma) (SING, 1999).

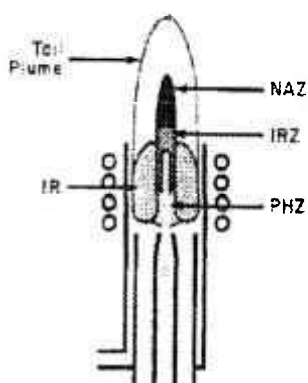
O plasma pode ser definido como um gás parcialmente ionizado formado eletromagneticamente por indução de rádio-freqüência acoplado ao gás argônio.

A literatura relata que a temperatura no ICP varia entre 6000 K e 10000 K. Estas temperaturas permitem a completa atomização dos elementos, minimizando os efeitos de interferência química (MOORE, 1989).

O plasma é formado por um fluxo tangencial de argônio fluindo entre dois tubos de quartzo. A energia de rádio-freqüência (tipicamente 700-1500W) é aplicada através da bobina, e um campo magnético oscilante é formado. O plasma é criado quando argônio é submetido a uma descarga elétrica, produzindo assim elétrons e íons. Dentro do campo magnético induzido, as partículas carregadas (elétrons e íons) são forçadas a fluir em um caminho anular fechado. Ao encontrar resistência ao seu fluxo, ocorre o aquecimento por atrito, provocando uma ionização adicional. A amostra é injetada como um aerosol através do centro do plasma. O argônio também é utilizado para transportar a amostra.

A descarga de plasma possui uma forma de gota branca brilhante muito intensa. Na FIG.1.1 é mostrada a representação da descarga do plasma com a nomenclatura para as diferentes regiões, como sugerido por Koirtyohann e colaboradores (MOORE, 1989; TODOLÍ, 2002). O corpo da descarga é chamado região de indução (IR), porque esta é a região na qual a energia indutiva é transferida da bobina para o plasma.

Na zona de pré-aquecimento (PHZ) ocorrem os processos de vaporização e atomização, enquanto que os processos de excitação e ionização ocorrem predominantemente na zona de radiação inicial (IRZ) e na zona analítica normal (NAZ). A zona NAZ é a região do plasma a partir da qual a emissão do analito é tipicamente medida.



IR: Região de indução
 PHZ: Zona de pré-aquecimento
 IRZ: Zona de radiação inicial
 NAZ: Zona analítica normal

FIGURA 1.1: Representação das diferentes regiões da descarga do plasma do ICP (Fonte: BOSS, 1997).

- EXCITAÇÃO DA AMOSTRA:

As amostras no estado líquido são nebulizadas como um aerosol, uma névoa muito fina de gotas de amostra que são introduzidas no ICP. O aerosol da amostra é então levado para o centro do plasma pelo fluxo de argônio do nebulizador. A FIG. 1.2 representa os processos que ocorrem quando a amostra é introduzida no ICP.

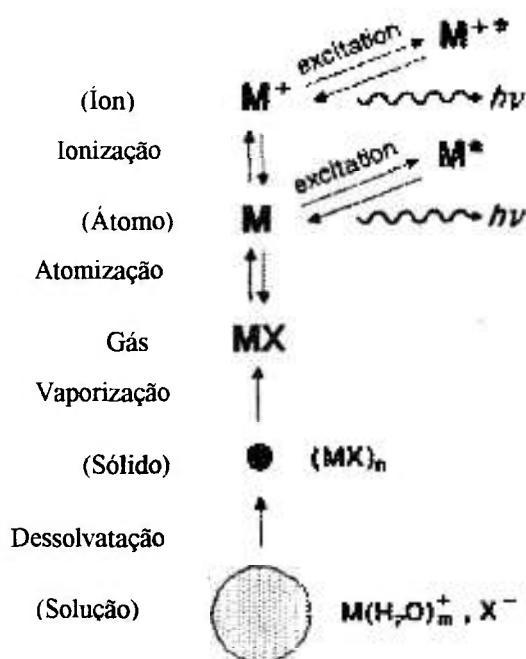


FIGURA 1.2: Representação do processo de emissão no plasma (Fonte: BOSS, 1997).

A função primeira da alta temperatura do plasma é remover o solvente ou dessolvatar o aerosol, deixando a amostra como partículas microscópicas de sal. Os passos seguintes envolvem a decomposição das partículas do sal num gás (vaporização) que são então dissociadas em átomos (atomização). Estes processos que ocorrem predominantemente na zona de pré-aquecimento (PHZ) (vide FIG. 1.1), são os mesmos processos que ocorrem na chama e no forno usados em espectrometria de absorção atômica.

Uma vez que o aerosol da amostra foi dessolvatado, vaporizado e atomizado, ele é excitado e ionizado. Para que o átomo ou íon possa emitir sua radiação característica, um de seus elétrons deve ser promovido a um nível de energia mais alto, através do processo de excitação.

Os processos de excitação e ionização ocorrem predominantemente na zona de radiação inicial (IRZ) e na zona analítica normal (NAZ).

1.4.1.1 Interferências em ICP OES:

Na técnica por ICP OES podem ocorrer os seguintes tipos de interferência: espectrais, de background e matriz.

1.4.1.1.1 Interferências espectrais:

As interferências espectrais ocorrem quando outras espécies presentes apresentam linhas espectrais próximas ou coincidentes a do elemento em determinação. O valor da intensidade medida será maior, resultando em uma concentração aparente maior do que a real.

A correção ou eliminação da interferência pode ser feita através de uma separação química do elemento interferente ou na escolha de um comprimento de onda alternativo.

1.4.1.1.2 Interferência de radiação de fundo:

Quando um sinal do analito é medido, a intensidade registrada consiste de duas partes: um sinal devido à presença do analito, e um sinal devido à presença de gases do plasma (argônio), vapor de água, e outros elementos presentes na solução da amostra. Este último sinal é chamado de sinal de background.

O “background” torna-se representativo quando a concentração do elemento em determinação está próxima do limite de detecção (considerado como relação sinal/ruído).

Os espectrômetros comerciais apresentam a possibilidade de correção do sinal de fundo (correção do “background”).

1.4.1.1.3 Interferência de matriz:

Está associada às etapas dos processos de: nebulização, transporte, dessolvatação, vaporização, atomização, ionização, excitação e emissão.

As propriedades físicas da amostra em solução são responsáveis pela mudança na velocidade com que a amostra é transportada para a fonte de excitação e pela formação do aerosol.

Assim, deve-se levar em consideração: a viscosidade, a tensão superficial e a presença de sólidos em suspensão. Para contornar este tipo de interferência é recomendável que se prepare padrões com composição semelhante à das amostras.

1.4.2 Análise por ativação com nêutrons instrumental (AANI)

O método de análise por ativação com nêutrons (AAN) baseia-se na conversão de núcleos atômicos estáveis em núcleos radioativos pela irradiação com nêutrons e subsequente medida da radiação emitida por estes núcleos radioativos. Dentre os vários tipos de radiação

que podem ser emitidos, a radiação gama oferece as melhores características para a determinação seletiva e simultânea dos elementos (BODE, 1996).

Dependendo do elemento a ser determinado, a AAN pode ser empregada de duas formas:

- a) Análise por ativação com nêutrons com separação radioquímica: a amostra radioativa resultante é decomposta quimicamente, e por procedimentos químicos, como precipitação, troca iônica ou extração por solventes, os radionuclídeos são separados e as possíveis interferências eliminadas;
- b) Análise por ativação com nêutrons instrumental (AANI) ou não-destrutivo: os radionuclídeos são determinados em função das energias dos raios gama e do tempo de meia-vida, sem a necessidade de ataque químico da amostra.

Para uma análise multi-elementar completa, os elementos são divididos em três grupos dependendo da meia-vida de seus produtos da irradiação com nêutrons:

- a) curta (2 min – 15 horas)
- b) intermediária (0,5 – 5 dias)
- c) longa (maior que 5 dias)

As mesmas amostras usadas para a irradiação curta podem ser utilizadas para irradiações longas, ou novas amostras podem ser preparadas.

1.4.2.1 Características da AANI:

- a) O método é não-destrutivo. Não há necessidade de dissolver a amostra previamente em solução para a análise;
- b) Há muitos parâmetros experimentais que podem ser ajustados para se obter um melhor limite de detecção para o elemento desejado. A energia e o fluxo de nêutrons podem ser variados para permitir uma ativação seletiva. O tempo de irradiação pode ser variado, resultando numa ativação intensificada dos elementos com radionuclídeos com tempo de meia-vida curtos. As diferenças nas meia-vidas entre os vários radionuclídeos são uma ferramenta para distingui-los. As interferências espectrais podem ser superadas usando-se linhas múltiplas de raios-gama e radionuclídeos múltiplos para identificar os elementos;
- c) O método produz dados multi-elementares simultâneos;

- d) Limites de detecção da ordem de mg kg^{-1} a $\mu\text{g kg}^{-1}$ podem ser obtidos para muitos elementos;
- e) AAN é um método baseado em processos que ocorrem nos núcleos dos elementos. Os estados químicos e físicos dos elementos não influenciam no resultado final;
- f) A ausência de etapas de pré-tratamento de amostra, mas acima de tudo a natureza física da técnica proporciona resultados exatos;
- g) A ausência de qualquer etapa de pré-tratamento de amostra (com os possíveis riscos de introdução de contaminantes) faz a técnica de AANI ser muito adequada para a medida de elementos em baixas concentrações e para manusear pequenas quantidades de amostra.
- h) Dentre os principais componentes presentes em muitas amostras, os elementos C, H, N e O se ativam pouco.

1.4.2.2 Ativação:

O princípio envolvido na análise por ativação com nêutrons consiste na irradiação da amostra com nêutrons num reator nuclear. Neste processo, isótopos estáveis são convertidos em isótopos radioativos; durante o decaimento desses isótopos (com meia-vidas variando de segundos a anos) há emissão de diferentes tipos de radiação, entre eles a radiação gama.

Cada radionuclídeo emite radiação gama de um certo comprimento de onda ou energia. As energias medidas são únicas para cada isótopo. Então, com o espectro gama, pode-se determinar quais elementos correspondem a uma determinada energia. Esta radiação gama é medida em espectrômetros de raios gama.

Cada núcleo atômico pode capturar um nêutron durante a irradiação. Uma reação nuclear resulta freqüentemente em mudança da massa nuclear; imediatamente após a captura o excesso de energia será emitido na forma de fótons e/ou partículas. O novo núcleo formado é instável. Quando instável, já durante a ativação, ele começa a decair ao estado estável pela emissão da radiação.

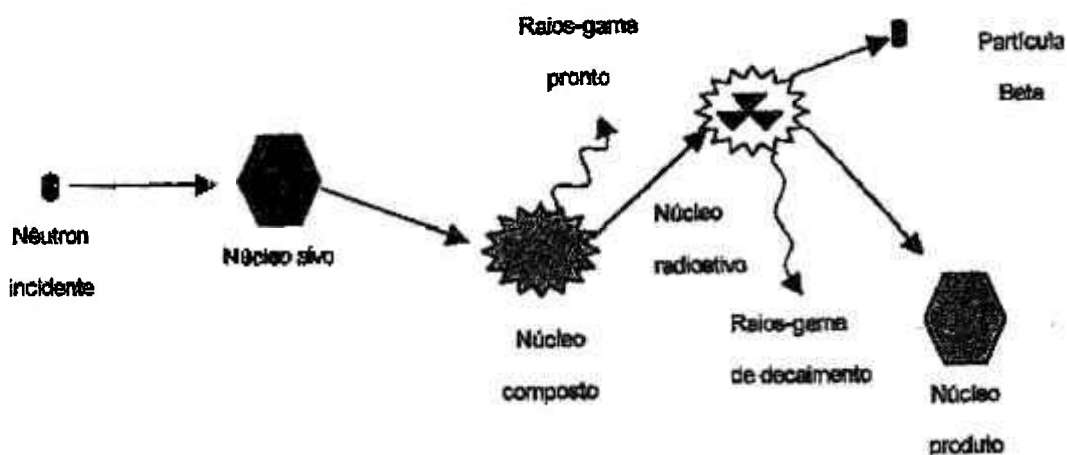


FIGURA 1.3: Representação para o processo de captura de um nêutron por um núcleo alvo seguido pela emissão de raios gama (Fonte: GLASCOCK, 2002).

A reação mais comum que ocorre em AAN é a reação (n, γ) , onde um nêutron é capturado e a radiação γ é emitida.

Na maioria dos processos de AANI são usados nêutrons térmicos ou de baixa energia.

Em princípio, os materiais podem ser ativados em qualquer estado físico: sólido, líquido ou gasoso. Não há necessidade de converter o material sólido em solução para a ativação; AANI é essencialmente considerada uma técnica não-destrutiva, embora sob certas condições algum dano pode ocorrer devido ao aquecimento térmico, radiólise (produção de gases que podem levar a explosões) e rastros de radiação devido aos fragmentos de fissão e núcleos que emitem radiação α .

1.4.2.3 Medida:

As transformações nucleares são estabelecidas pela medida do número de decaimentos nucleares.

O espectro da radiação gama emitida em combinação com a meia-vida do radionuclídeo faz com que este seja identificado. A medida em ANNI é feita usando-se um espectrômetro de raios gama. Nos espectrômetros de raios gama são utilizados detectores de

germânio acoplados a uma eletrônica constituída por: amplificador, conversor, analisador multi-canal e microcomputador.

1.4.2.4 Análise do espectro de raios gama:

Os espectros de raios gama obtidos são analisados por programas de computação, que localizam os picos de absorção total, determinam suas energias e calculam suas áreas. O número de desintegrações detectadas para uma dada energia é diretamente proporcional à quantidade do isótopo alvo existente na amostra.

A concentração é obtida pela comparação de áreas de picos referentes a padrões que são ativados juntamente com as amostras, utilizando-se para o cálculo a seguinte expressão:

$$C_a^i = (A_a^i m_p C_p^i) e^{\lambda(t - t_p)} / A_p^i m_a \quad (1.1)$$

onde:

C_a^i : Concentração do elemento i na amostra

C_p^i : Concentração do elemento i no padrão

A_a^i : Taxa de contagem para o elemento i na amostra

A_p^i : Taxa de contagem para o elemento i no padrão

m_a e m_p : massas da amostra e padrão, respectivamente

λ : constante de decaimento do radioisótopo

t : tempo de decaimento

CAPÍTULO 2

CONSIDERAÇÕES SOBRE AS TÉCNICAS DE DISSOLUÇÃO DE AMOSTRA DE ALIMENTOS

A determinação de minerais e elementos-traço em alimentos por técnicas espectroscópicas geralmente envolve um pré-tratamento da amostra. Na literatura podemos encontrar diferentes procedimentos aplicados à dissolução da amostra, e os principais foram discutidos nos itens subseqüentes.

2.1 Definições

O termo dissolução significa que a amostra sólida, líquida ou gasosa é dissolvida em líquidos adequados a baixa temperatura, com ou sem reação química (BOCK, 1979). Entretanto, nos laboratórios analíticos brasileiros encontramos os termos solubilização, decomposição, digestão ou destruição que são utilizados sem distinção rígida entre estes termos (KRUG, 2000).

2.2 Destruição da matéria orgânica

Idealmente um procedimento de digestão de uma amostra deve apresentar simplicidade, rapidez, utilizar pequenos volumes de reagentes, permitir a dissolução de grande número de amostras e finalmente, produzir resultados exatos e repetitivos.

Para quantificar uma espécie química, em geral, é necessário um tratamento de amostra por digestão ácida ou fusão alcalina, a qual exige intenso trabalho, tempo (70-95% do tempo que compreende todo o processo analítico), um elevado custo, além disso, durante a dissolução podem ocorrer perdas do analito e/ou contaminações (ARRUDA, 1997).

Para a destruição da matéria orgânica, dois grupos de procedimentos principais podem ser distinguidos:

a) procedimentos de digestão via seca;

b) procedimentos de digestão via úmida;

2.2.1 Digestão via seca:

A destruição da matéria orgânica por via seca consiste na calcinação da matéria orgânica usando-se um forno mufla. Dentro deste grupo, a digestão em elevadas temperaturas à pressão atmosférica é o método mais freqüentemente aplicado. Esse tipo de tratamento é aplicável à maioria dos alimentos e metais, exceto metais voláteis como o mercúrio, arsênio e selênio. Outros elementos voláteis como cádmio, chumbo, tálio, podem tolerar temperaturas comumente usadas (450°C – 550°C) sem muita perda, com um programa de aquecimento que assegura um gradiente de temperatura lento, evitando aquecimentos locais ou ignição espontânea da amostra com conseqüente perda do analito. Perdas também podem ocorrer quando a temperatura máxima programada é ultrapassada (HOENING, 1995; HOENING, 1996; HOENING, 2001).

Oxidantes podem ser usados como “ashing-aids” a fim de prevenir a volatilização dos analitos e acelerar o processo de digestão (JORHEM, 1993). Os “ashing-aids” comumente usados são o ácido nítrico, o óxido e o nitrato de magnésio de alta pureza, as cinzas sulfatadas, dentre outros (KRUSHEVSKA, 1992; HOENING, 1996).

As principais desvantagens da técnica são que a digestão aberta expõe a amostra à contaminação ambiental e o procedimento de digestão pode levar até dias, além da possibilidade de perdas.

A digestão incompleta também pode resultar em perda do analito devido a não liberação do analito do resíduo carbonáceo (JORHEM, 1995).

GOUVEIA et al. (2001) relataram que oxidação incompleta é observada devido à alta estabilidade de alguns compostos orgânicos presentes na amostra ou formados durante sua decomposição.

Na literatura podemos encontrar trabalhos que discutem a aplicação de diferentes temperaturas para digestão de amostras. AMARO-LÓPEZ et al. (1996) relataram que a temperatura mais comumente empregada em digestão por via seca ficava em torno de 450°C a 500°C e que somente acima de 500°C começavam a ocorrer perdas de elementos traço em amostras de leite e produtos lácteos.

O controle da temperatura é necessário, pois caso contrário, os sais de metais formados podem se volatilizar.

Os recipientes usados neste tipo de destruição de matéria orgânica são: cápsulas de platina, de porcelana ou béquer tipo pyrex; para este tipo de procedimento de tratamento de amostra as temperaturas variam entre 200°C a 600 °C, além disso há possibilidade de se adicionar "ashing-aid".

ROMERO (1992) avaliou as possíveis perdas de Pb, Cd, Co, Ni, Fe, Cu e Zn quando amostras de atum foram calcinadas a diferentes temperaturas. O autor verificou que à temperatura de 350°C a destruição da matéria orgânica não foi completa, o que levou à baixas recuperações para Cu, Ni e Co que foram de 11,9; 7,9 e 21,0%, respectivamente. Quando a temperatura de calcinação foi aumentada para 425°C, ainda assim não foi obtida destruição total da amostra, porém obteve-se recuperação aceitável para todos os metais analisados, que variaram entre 89% a 101% . Para uma temperatura de calcinação de 475°C foram detectadas perdas ligeiramente maiores que no caso anterior, que foram de 10,0% para Pb; 10,2% para Zn; 7,7% para Cu e para o restante dos metais as perdas foram menores que 5%. Finalmente, ao se empregar uma temperatura de calcinação final de 550°C, as perdas ocasionadas foram significativas para todos os metais, desde 8,4% para Cd até 54% para Pb, sendo superiores a 15% para o restante dos metais analisados. O autor concluiu que é importante um controle rigoroso da temperatura final, assim como o incremento da mesma a fim de minimizar as perdas (ROMERO, 1992).

Em métodos de digestão via seca, o produto do processo de oxidação é uma mistura de sais inorgânicos, tais como carbonatos, sulfatos, fosfatos, haletos ou silicatos, que são dissolvidos num ácido apropriado (NOVOZAMSKY, 1995; HOENING, 1996).

Comparando-se com os métodos de digestão via úmida, a maior vantagem do procedimento de digestão por via seca está na possibilidade de pré-concentração, isto é, digerir grandes quantidades de amostra e dissolver a cinza resultante num pequeno volume de ácido, o que é útil quando concentrações muito baixas são determinadas. A cinza resultante é completamente livre de matéria orgânica, o que é um pré-requisito para algumas técnicas analíticas, como o ICP-MS ou a voltametria (KARADJOVA, 2000). Além disso, o método permite a manipulação simultânea de várias amostras, não é muito trabalhoso, já que não é necessário monitorização contínua por parte do analista.

No tratamento das amostras por via seca, basicamente as possíveis variáveis a controlar estão representadas pela temperatura e tempo de incineração, a natureza dos recipientes onde se realiza a digestão, o material que reveste a mufla, o tipo de mistura ácida empregada para a dissolução das cinzas e mais recentemente, o sistema de aquecimento (JORHEM, 1995; SUBRAMANIAN, 1996).

A digestão via seca além de ser aplicável a diferentes tipos de alimentos tem sido empregada para amostras biológicas (SUBRAMANIAN, 1996).

2.2.2 Digestão via úmida:

Na digestão por via úmida a matéria orgânica é destruída usando-se ácidos e/ou oxidantes (como H_2O_2 , $KMnO_4$, $KClO_4$) de forma individual ou combinada (AMARO-LÓPEZ, 1996).

A digestão da amostra por via úmida em sistema aberto (à pressão atmosférica) é uma das técnicas mais antigas e usadas para a dissolução de matéria orgânica e inorgânica (KNAPP, 1991).

Convencionalmente na digestão via úmida, a amostra e a mistura ácida são levadas à secura, esfriadas e então submetidas ao reaquecimento com mais ácido para assegurar a dissolução da matriz (SMITH, 1996; HOENING, 1998).

As digestões por via úmida podem ser feitas sob aquecimento condutivo à pressão atmosférica em chapa elétrica ou bloco digestor ou à elevada pressão e temperatura com frascos de pressão (bombas de pressão) (FAGIOLI, 1990; BIURRUN, 1991; OLES, 1991; KRUSHEVSKA, 1992; BRATTER, 1995a; KARADJOVA, 2000) e mais recentemente, em fornos de microondas (KRUSHEVSKA, 1993; RODUSHKIN, 1999).

Digestões ácidas podem ser realizadas em sistemas abertos, usando-se frascos pyrex, quartzo ou PTFE com ou sem refluxo ou em sistemas fechados com frascos de PTFE e algumas vezes em frascos de quartzo à alta pressão (HOENING, 1996). A digestão em sistema fechado é geralmente muito mais eficiente que a digestão realizada em frascos abertos, onde a perda de elementos voláteis pode ser evitada e a decomposição de amostras mais difíceis é possível, além de evitar a contaminação pelo ambiente (KNAPP, 1991; AMARASIRIWARDENA, 1997).

A massa da amostra é limitada em sistemas fechados, devido ao risco de explosão. Conforme o tipo de matriz e reagentes utilizados para a digestão, verifica-se aumento na evolução de gases com conseqüente aumento da pressão a tal ponto que explosões podem ocorrer. Usualmente somente cerca de 100 mg a 300 mg de amostra são usados, comparado a 2g em sistemas abertos (HOENING, 1996). Uma vantagem dos sistemas fechados é que as perdas por volatilização podem ser minimizadas.

Durante a digestão via úmida, o controle do tempo de digestão é um dos fatores de grande importância que pode influenciar nos resultados analíticos. RODUSHKIN et al. (1999) determinaram a dependência do tempo de digestão (em bloco digestor com temperatura de 120°C e ácido nítrico, como reagente para a determinação de metais em amostras de planta) com a concentração do analito. Verificou-se que concentrações de K, Ca, Mg, Ba, Sr, Zn, Cu e As no digerido alcançaram um nível constante após 45 minutos de digestão, enquanto que para Al e Ti as concentrações continuaram a aumentar, mesmo após 8 horas de digestão. Concentrações de outros elementos estabilizaram entre 1,5 h (para Pb, Hg, Cd, P, S, Mn) e 4 horas (V, Cr).

O tipo de ácido usado em procedimentos de preparação de amostra pode ter conseqüências importantes durante a etapa de medição. Ácido nítrico em concentrações de até 10% não causa severos problemas analíticos em praticamente todas as técnicas de espectrometria atômica observadas (SUBRAMANIAN, 1996). O ácido nítrico é o reagente mais usado para a decomposição de matéria orgânica e pode ser associado ao ácido sulfúrico, perclórico ou ao peróxido de hidrogênio, que faz aumentar sua eficiência de oxidação (HOENING, 1996). A digestão com uso somente de ácido nítrico, na digestão via úmida em chapa (KNAPP, 1991; MINGORANCE, 1993; REID, 1995) ou em microondas (KRUSHEVSKA, 1992) é insuficiente para oxidar completamente amostras com alto teor de proteína e/ou gordura.

A presença de ácido clorídrico não causa problemas na análise por ICP OES; por outro lado seu uso em análise de GFAAS (espectrometria de absorção atômica com forno de grafite) é desaconselhável, devido à possível formação de cloretos do analito, sendo geradas as interferências na fase vapor e/ou espectral. Para aplicações em análise por ICP-MS, o uso de ácido clorídrico é indesejável devido às interferências isobáricas, como no caso da determinação de arsênio, onde o cloreto presente na amostra combina-se com o argônio

presente no plasma, formando então $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ de massa idêntica a do arsênio. Ambas massas são detectadas simultaneamente levando à concentrações aparentemente maiores para arsênio (HOENING, 1996).

Devido à alta viscosidade, a utilização de ácido sulfúrico é freqüentemente evitada, mesmo que sua eficiência seja grande em procedimentos de decomposição de amostras orgânicas. Sua presença em soluções é particularmente indesejável, devido às possíveis interferências físicas quando se utilizam técnicas analíticas como FAAS (espectrometria de absorção atômica com chama) e ICP OES (espectrometria de emissão atômica com plasma de argônio acoplado indutivamente) (HOENING, 2001). Em ICP-MS (espectrometria de emissão atômica com massa) o uso de ácido sulfúrico deve ser evitado devido à tendência em causar problemas de interferência poliatômica e também degradação do cone de amostragem (EMMETT, 1988). A insolubilidade de sulfatos alcalino-terrosos pode causar dificuldades quando se trabalha com amostras ricas nesses elementos, tais como ossos ou leite (AMARO-LÓPEZ, 1996). Alguns elementos traço, como é o caso do chumbo também formam sulfatos insolúveis. O ponto de ebulição alto do ácido sulfúrico dificulta a remoção do seu excesso após a digestão completa da amostra. A presença de ácido sulfúrico em misturas contendo outros agentes oxidantes também serve para elevar o ponto de ebulição e assim, aumentar sua ação.

Misturas de $\text{HNO}_3 - \text{H}_2\text{SO}_4$ foram utilizados eficientemente para digestão de amostras com baixo conteúdo de carboidratos ou gordura para a determinação de cromo e manganês por FAAS e GFAAS (Tinggi, 1997).

ZACHARIADIS e colaboradores (1995) relataram que para a determinação de cádmio em carnes e peixes a volatilização do elemento a 450°C pôde ser evitada com uso de ácido sulfúrico.

Na literatura pode-se encontrar trabalhos que relatam as diferentes temperaturas usadas durante a digestão da matriz causando perdas de cádmio, não existindo um consenso sobre uma única temperatura a partir da qual começam a ocorrer perdas (ROMERO, 1992; JORHEM, 1995). Relata-se também que se o gradiente de temperatura programado durante a digestão da amostra for suficientemente baixo não ocorrem perdas de elementos voláteis como chumbo, cádmio ou zinco (HOENING, 1995).

Ácido perclórico é um reagente extremamente eficiente na destruição da matéria orgânica, mas geralmente é evitado devido aos riscos de explosão (HOENING, 1996). Além disso, pode causar a precipitação de potássio caso este se apresente na forma de KClO_4 em concentrações elevadas. O uso de ácido perclórico também não é recomendado para a determinação de cromo devido à volatilidade dos percloratos de cromo (AMARO-LÓPEZ, 1996).

As vantagens em se utilizar mistura de HNO_3 - HClO_4 incluem o uso de temperaturas relativamente baixas, rapidez na oxidação, menor risco de volatilização (MORENO-TORRES, 2000). Dependendo do analito a ser determinado a eficiência no uso de ácido perclórico pode ser variada. SUN et al. (2000) utilizaram esta mistura para digestão de materiais de referência de leite, ostra, arroz, espinafre, fígado, fórmula infantil, ovo, o qual foi eficiente para a determinação de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, S, Sr e Zn por ICP OES. Já TINGGI e colaboradores (1997) relataram que o uso de ácido perclórico resultava em efeito de memória e conseqüentemente baixa reprodutibilidade para a determinação de cromo em alimentos por GFAAS (espectrometria de absorção atômica com forno de grafite).

Misturas de ácidos com H_2O_2 são particularmente eficientes na oxidação de matéria orgânica (HOENING, 1996) e têm sido utilizados com sucesso em substituição ao uso de ácido perclórico (MATUSIEWICZ, 1989; AMARO-LÓPEZ, 1996).

A desvantagem da digestão por via úmida é que geralmente há a necessidade de se utilizar uma grande quantidade de reagentes que pode levar à contaminação da amostra, aumentando as interferências causadas pelos concomitantes. Para evitar ou minimizar esse problema, deve-se usar reagentes de alto grau de pureza, que são de alto custo e que conseqüentemente, aumentam o custo de análise.

2.2.3 Digestão via úmida por microondas:

Digestão completa por via úmida convencional é lenta, tediosa e perigosa quando se usa oxidantes fortes. Além disso, necessita de grande quantidade de reagentes e supervisão constante do analista. Assim, o uso de microondas tornou-se uma alternativa muito eficiente para as técnicas de aquecimento por convecção, como fonte de energia para procedimentos de digestão via úmida.

Define-se microondas como ondas eletromagnéticas, com frequências compreendidas entre 3 e 300.000 Mhz e comprimentos de onda entre 0,1 a 100 cm.

A energia de microondas é uma radiação eletromagnética não-ionizante que provoca movimento das espécies em solução pela migração de íons e/ou rotações de dipolo, causadas pelo elevado número de vezes em que o campo eletromagnético se alterna. Devido a esse mecanismo de stress induzido, ocorre o aquecimento, sendo que o mesmo não é produzido por fonte externa de aquecimento, mas sim pela interação entre as microondas e as moléculas da amostra. Então, para que haja aquecimento, é necessária a presença de moléculas polares e íons em solução (ARRUDA, 1997; BATISTA, 1995).

O uso de energia de microondas como método de aquecimento para digestões ácidas foi primeiramente demonstrada em 1975 (KINGSTON, 1986; SMITH, 1996; ARRUDA, 1997). Desde aquela época, a técnica avançou a partir do uso do microondas caseiro para digestões até em equipamentos de uso exclusivo em laboratório.

Reduções no tempo de preparação de amostra e a versatilidade do tipo de amostra são vantagens no uso de microondas fechado comparado com os métodos clássicos de digestão por via úmida.

A energia de microondas é transmitida através das paredes dos recipientes feitos de vidro, quartzo ou plásticos, como o polipropileno, PTFE, teflon PFA ou TFM. Ácidos minerais como o HNO_3 , HCl e H_2SO_4 absorvem energia de microondas e aquecem muito rapidamente. No aquecimento por forno de microondas podem ser utilizados dois tipos de sistemas, os de vaso fechado (a elevadas pressões) ou aberto (à pressão atmosférica) (KRUSHEVSKA, 1992; KRUSHEVSKA, 1993).

SCHNITZER et al. (1995) compararam os procedimentos de digestão por microondas nos sistemas fechado e aberto para a determinação de mercúrio em peixes. Foi relatado que embora o sistema fechado fosse mais eficiente, as altas pressões geradas durante a digestão poderiam provocar risco de explosão devendo-se, portanto, ter cautela em seu uso.

O uso de forno de microondas focalizado (sistema aberto) oferece uma série de vantagens: operação à pressão atmosférica, flexibilidade nas condições de digestão com tubos disponíveis em vidro, teflon e quartzo, variedade de reagentes que podem ser usados, bem como a possibilidade de total automação para adição de reagentes (FEINBERG, 1991; GAWALKO, 1997).

A maior redução no tempo de digestão combina a velocidade de aquecimento das microondas com a elevada temperatura. Isto é bastante útil quando se trabalha com amostras constituídas por carboidratos, que somente se decompõem a 140°C ou por proteínas, cuja temperatura de decomposição é de 150°C ou ainda por lipídeos, que somente se decompõem a 160°C (REID, 1995).

Uma digestão efetuada em forno de microondas pode reduzir o tempo em cerca de 80% aproximadamente, porém quando o alimento possui muita gordura em sua composição as condições para a digestão devem ser mais drásticas, uma vez que se necessita maior poder oxidativo e maior tempo de digestão (DE LA FUENTE, 1997). DUNEMANN e MEINERLING (1992) recomendaram técnicas que usassem sistemas fechados para digerir eficientemente amostras com alto teor de gordura.

As altas temperaturas nas digestões por microondas produzem um aumento significativo na capacidade de oxidação e formam intermediários, como radicais livres que facilitam o ataque químico nos compostos, acelerando o processo de digestão (KINGSTON, 1986; DE LA FUENTE, 1995c, KUBRAKOVA, 1997).

O aumento na adesão ao uso da técnica de microondas como método de digestão, reflete-se pelo crescente número de publicações dos últimos anos. Microondas estão sendo utilizadas para digestões de amostras de produtos alimentícios e materiais biológicos, dentre outros (KUSS, 1992; DE LA FUENTE, 1995a; BRATTER, 1995a; TAHÁN, 1995; ZHOU, 1996; GAWALKO, 1997; SUN, 1997; BURGUERA, 1998; PEDRO, 1998).

A massa da amostra empregada em microondas abrange um intervalo de 20 mg até 10g, porém a quantidade mais freqüentemente utilizada está entre 200 mg e 500 mg. Estas quantidades são variáveis levando-se em conta o tipo de matriz a ser digerida, o tipo de forno utilizado e os reagentes selecionados para a digestão (ARRUDA, 1997).

O fator limitante das digestões em microondas fechado está na pequena quantidade de amostra que pode ser digerida (geralmente 0,1 g a 0,3 g), restringindo a escolha da metodologia para a determinação de elementos que se encontram em baixas concentrações nas amostras (HOENING, 1996). No sistema fechado, as amostras reagem com os ácidos usados formando gases e conseqüentemente aumento da pressão. Dependendo do tipo de amostra, o aumento de pressão pode ocasionar rompimento do selo de segurança do vaso do forno de microondas e ocasionar perda da amostra. Em virtude disso, neste trabalho optou-se pelo uso

de microondas focalizado para estudo de procedimentos de preparação de amostra para análise de minerais em leite e produtos lácteos.

2.2.4 Outros métodos de tratamento de amostra:

Até o presente momento, o principal obstáculo para reduzir o tempo de análise para a determinação de minerais está no estágio de preparação de amostra. Métodos analíticos usando digestão por via seca necessitam que a amostra fique muito tempo num forno mufla. Procedimentos de digestão via úmida utilizam ácidos concentrados e necessitam de cuidados maiores para monitorizar a digestão por vários períodos. Assim, outros métodos de preparo de amostra diferentes dos tradicionalmente empregados (digestão via seca ou via úmida) podem ser encontrados na literatura, dentre eles pode-se citar a técnica de suspensão (slurry), desproteíntização da amostra e a extração ácida.

Aplicação da técnica de suspensão (slurry) como alternativa à digestão de amostras tem sido utilizada para análise de minerais em leite. A aspiração direta de soluções aquosas de leite em ICP resultou em baixa sensibilidade e exatidão, que foram atribuídas ao conteúdo gorduroso do leite (EMMETT, 1988). Em contraste, outros estudos enfatizaram a importância de emulsificar amostras de leite para a determinação de seu conteúdo mineral com adição de agentes estabilizantes, tais como: Triton X-100, viscalex, glicerol, trietanolamina, dentre outros (DE BENZO, 1991; DE LA GUARDÍA, 1986; CARRIÓN, 1994; BERMEJO-BARRERA, 1995; GARCÍA, 1996; EBDON, 1997; NÓBREGA, 1997; MAGALHÃES, 1998; MURCIA, 1999). McKINSTRY e colaboradores (1999) também sugeriram a técnica de slurry para análise de amostras de leite e fórmulas infantis. Foi verificado que produtos à base de soja e aqueles suplementados com fosfato de cálcio exibiram instabilidade da suspensão, mesmo utilizando um agente estabilizante, afetando as recuperações para cálcio e magnésio. HUA et al. (2000) também tentaram utilizar um dispersante para análise direta de amostras de leite, porém verificaram que produtos suplementados com carbonato de cálcio não foram adequados para serem analisados por esta técnica.

Procedimentos de desproteíntização da amostra com ácido tricloroacético também têm sido utilizados para análise de leite. DE LA FUENTE et al. (1995b) compararam métodos de dissolução de amostra por microondas com o procedimento de precipitação de proteínas do leite com ácido tricloroacético (TCA) para a determinação de cálcio, magnésio, sódio e

potássio, conseguindo concentrações concordantes para esses elementos entre os métodos utilizados.

Existem também os métodos de digestão que se baseiam numa extração ácida, onde os metais são extraídos da matriz enquanto a amostra é deixada em contato com solução diluída de ácido nítrico ou clorídrico sob ebulição. Este é um método recomendado para análise de gorduras, óleos e produtos similares (SKURIKHIN, 1993).

BERMEJO-BARRERA et al. (2000) relataram que os tempos normalmente utilizados em métodos de extração ácida variavam entre 30 e 180 minutos para a determinação de metais a partir de amostras de sedimentos, solo, mexilhão e alimentos.

O método de extração também foi usado para extrair numerosos elementos de vegetais utilizando ácidos diluídos, especialmente com ácido nítrico, clorídrico ou uma mistura de ambos, a maioria sob condições relativamente suaves (WELZ, 1999).

Apesar do método de extração seja efetuado em condições suaves, quinze minutos de extração do material vegetal em ácido clorídrico 1M a 80°C foram suficientes para a obtenção de resultados concordantes para Ca, Cu, K, Mg, Mn e Zn em comparação com os resultados obtidos após digestão realizada com ácido nítrico e perclórico; para ferro e fósforo as recuperações obtidas foram baixas (de 50 a 70%) (WELZ, 1999).

A vantagem desta técnica se deve ao fato do consumo de reagentes utilizado no procedimento de extração ácida ser baixo devido ao fato da decomposição total da amostra não ser necessária (BERMEJO-BARRERA, 2000).

A escolha da técnica de digestão deve levar em conta a natureza e concentração do analito, o tipo de matriz, o tamanho da amostra e os requisitos e limitações de cada técnica instrumental a ser usada.

Não há técnica de digestão universal capaz de cobrir diferentes matrizes, assim encontramos na literatura vários trabalhos comparando os diferentes procedimentos de digestão para um determinado grupo de matrizes (ALKANANI, 1994; BRATTER, 1995a; RODUSHKIN, 1999; BORKOWSKA-BURNECKA, 2000; SUN, 2000).

Para a análise de leite alguns trabalhos utilizaram a digestão via seca (GAINES, 1990; CONI, 1994) ou a digestão via úmida em chapa ou com bomba de pressão (ALKANANI, 1994; BORKOWSKA-BURNECKA, 1996; AMARASIRIWARDENA, 1997)

ou ainda utilizaram o forno de microondas para digerir as amostras (JORHEM, 2000; OLIVEIRA, 2000; SILVESTRE, 2000).

Assim, torna-se necessário um estudo para determinar minerais em leite e derivados de forma mais ágil, levando-se em conta as vantagens e desvantagens dos métodos de dissolução da amostra, e que possibilite o estabelecimento de condições mais brandas, com menor variedade de reagentes e a concentração mais baixa dos mesmos. Uma vez definidas as melhores condições para a digestão das amostras de leite para a análise por ICP OES, este procedimento foi adotado para a dissolução das amostras de produtos lácteos.

CAPÍTULO 3

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 AMOSTRAS

No presente trabalho foram analisadas amostras de leite em pó integral, leite em pó desnatado, queijos minas, mussarela, prato, parmesão, petit suisse, iogurte e achocolatado.

As amostras foram adquiridas no comércio da cidade de São Paulo, SP, entre os anos de 2000 e 2001.

3.2 ANALISE POR ATIVAÇÃO COM NÊUTRONS – AANI

3.2.1 Preparação das amostras de leite em pó e dos produtos lácteos para irradiação

As amostras de leite integral e desnatado foram analisadas por AANI sem pré-tratamento. As amostras dos lácteos (queijos minas, mussarela, prato, parmesão, petit suisse, iogurte e achocolatado), foram liofilizadas antes de serem analisadas pela técnica de ativação com nêutrons.

Para a liofilização as amostras de queijo minas, mussarela, prato e parmesão foram previamente trituradas em multi-processador cujas lâminas eram de titânio; em seguida foram colocadas em bandejas e espalhadas em finas camadas, congeladas por 24 horas e levadas ao liofilizador, modelo 30P2 - Edwards, por cerca de 36 horas. Após a liofilização, as amostras foram trituradas e acondicionadas em sacos plásticos, previamente desmineralizados com solução diluída de ácido nítrico e enxaguados com água Milli-Q.

As amostras de queijo petit suisse, iogurte e achocolatado foram previamente homogeneizadas, colocadas em finas camadas em placas de Petri, congeladas por 24 horas e levadas ao liofilizador por cerca de 24 horas, seguindo o mesmo procedimento dado às amostras de queijo para a liofilização.

Cerca de 100 mg das amostras de produtos lácteos liofilizados foram pesados em envelopes de polietileno, previamente limpos com ácido nítrico 20% por 24 horas, para a determinação de radionuclídeos de meia-vida curta e intermediária. Para a determinação de radionuclídeos de meia-vida longa foram utilizados cerca de 200 mg de amostra.

3.2.2 Preparação dos materiais de referência para irradiação

Foram pesados separadamente cerca de 80 mg (para irradiação curta) e 150 mg (para irradiação longa) dos materiais de referência certificados, NIST 8435 Whole Milk Powder e NIST 1549 Non Fat Milk Powder, em envelopes de polietileno. Estes envelopes foram selados e rotulados.

3.2.3 Padrões utilizados na AANI

Os padrões dos elementos a serem analisados foram preparados pipetando-se a solução padrão sobre tiras de papel de filtro Whatman n^o 42, de dimensões de 2,0 x 2,0 cm, os quais foram secas sob lâmpada de raios infra-vermelhos. Os papéis de filtro assim preparados foram acondicionados em envelopes de polietileno, para serem posteriormente irradiados em conjunto com a amostra e os materiais de referência.

Foram preparados padrões multi-elementares de cálcio e magnésio, ferro e zinco, potássio e manganês e padrão mono-elementar de sódio, cujas massas estão na tabela 3.1.

Tabela 3.1 Dados dos padrões sintéticos utilizados na AANI

Elemento	Solução padrão (Spex)	Massa do elemento irradiada (µg)
Ca	10.000 mg L ⁻¹	1000
Fe	10.000 mg L ⁻¹	1000
K	10.000 mg L ⁻¹	1000
Mg	10.000 mg L ⁻¹	1000
Mn	200 mg L ⁻¹	5
Na	1000 mg L ⁻¹	250
Zn	1000 mg L ⁻¹	25

3.2.4 Irradiação das amostras e padrões

3.2.4.1 Determinação dos elementos sódio, potássio, manganês, magnésio e cálcio

Os envelopes contendo a amostra, os materiais de referência e os padrões foram colocados juntos num outro envelope de polietileno. Este último foi envolto por uma tira de espuma e colocado num recipiente de polietileno, de dimensões de 8 x 15 cm . Este recipiente

foi irradiado por 2 minutos em um fluxo de nêutrons térmicos de cerca de 10^{11} n cm⁻² s⁻¹ no reator IEA-R1 do IPEN/CNEN-SP.

3.2.4.2 Determinação dos elementos cálcio, ferro e zinco

Os envelopes contendo a amostra, os materiais de referência e os padrões foram envoltos em folha de papel alumínio; a seguir foram inseridos em recipientes de alumínio cilíndrico e enviados para a irradiação por cerca de 8 horas sob fluxo de nêutrons de 10^{13} n cm⁻² s⁻¹ no reator IEA-R1 do IPEN/CNEN-SP.

3.2.5 Medidas das atividades das amostras e padrões

Após as irradiações curtas de 2 minutos, as amostras, material de referência e os padrões foram acondicionados em discos de aço inoxidável de 3 cm de diâmetro e procedeu-se às contagens por 300 a 600 segundos para os padrões e por cerca de 3600 segundos para as amostras e material de referência no espectrômetro de raios gama. Os espectros de raios gama foram processados por meio do programa VISPECT 2, que localiza os picos, determina suas energias e calcula suas áreas. Nessas condições foram determinados os elementos magnésio (²⁷Mg, $t_{1/2}$ =9,46 minutos), cálcio (⁴⁹Ca, $t_{1/2}$ =8,72 minutos), sódio (²⁴Na, $t_{1/2}$ =15 horas), manganês (⁵⁶Mn, $t_{1/2}$ =2,58 horas) e potássio (⁴²K, $t_{1/2}$ =12,36 horas).

Após as irradiações longas de 8 horas, o conjunto constituído por amostra, padrões e material de referência passou por um período de decaimento de aproximadamente treze dias; decorrido este tempo, procedeu-se à abertura do recipiente de irradiação e os envelopes das amostras, padrões e material de referência foram acondicionados em pequenos discos de aço inoxidável, para as contagens de 50.000 segundos (para as amostras), 30 minutos e 1 hora (para os padrões) novamente no espectrômetro de raios gama. Os espectros de raios gama foram processados por meio do programa VISPECT 2. Nessas condições foram determinados os elementos de meia-vida longa, como o ferro (⁵⁹Fe, $t_{1/2}$ =44,5 dias) e o zinco (⁶⁵Zn, $t_{1/2}$ =243,9 dias).

As medidas das atividades gama induzidas foram feitas com detector de germânio hiperpuro modelo POP TOP da EG&G ORTEC, com uma resolução de 1,90 keV para o pico de 1332,49 keV do ⁶⁰Co, acoplado a uma eletrônica associada.

3.2.6 Cálculo das concentrações

O cálculo das concentrações dos elementos analisados foi feito utilizando-se o programa PAKI e ESPECTRO desenvolvido na Supervisão de Radioquímica do IPEN/CNEN-SP. Uma vez que as amostras e padrões são irradiados juntos, conhecendo-se a concentração do elemento de interesse no padrão (ou material de referência), a atividade da amostra e padrão (ou material de referência) obtida através do processamento de picos pelos programas PAKI e/ou ESPECTRO e suas respectivas massas, os programas fornecem a concentração do analito na amostra, conforme a equação 1.1.

Como o processamento dos espectros das amostras e padrões (ou materiais de referência) é efetuado em diferentes tempos de decaimento e contagem, fornecendo-se o tempo exato em que são realizadas as medidas, o programa automaticamente corrige o decaimento para cada elemento na amostra e padrão, entre cada contagem.

3.3 ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ATÔMICA POR PLASMA DE ARGÔNIO ACOPLADO INDUTIVAMENTE – ICP OES

3.3.1 Padrões utilizados em ICP OES

O método foi proposto para a determinação simultânea de cálcio, cromo, cobre, ferro, potássio, magnésio, manganês, sódio, fósforo e zinco.

A partir da diluição de soluções padrão estoque de 10000 mg L⁻¹ e 1000 mg L⁻¹ destes elementos foi preparado um padrão estoque multi-elementar em solução a 10% de ácido clorídrico. Este padrão estoque foi diluído de 10 a 400 vezes em ácido clorídrico a 10%. Assim foi obtida a curva analítica constituída por cinco pontos. As concentrações dos padrões da curva analítica e estoque são mostradas na tabela 3.2. A curva analítica mostrou-se linear desde o primeiro ponto da curva até a concentração mais elevada.

- Tabela 3.2: Concentração dos padrões multi-elementares para o estabelecimento da curva de calibração (em mg L⁻¹)

ELE/O	PADRAO ESTOQUE	PADRÃO 1	PADRÃO 2	PADRÃO 3	PADRÃO 4	PADRÃO 5
Ca	1000	2,50	10,0	25,0	50,0	100,0
Cr	10	0,025	0,10	0,25	0,50	1,0
Cu	50	0,125	0,50	1,25	2,50	5,0
Fe	100	0,25	1,00	2,50	5,0	10,0
K	1000	2,50	10,0	25,0	50,0	100,0
Mg	250	0,625	2,50	6,25	12,50	25,0
Mn	5	0,0125	0,050	0,125	0,25	0,50
Na	1000	2,50	10,0	25,0	50,0	100,0
P	1000	2,50	10,0	25,0	50,0	100,0
Zn	100	0,25	1,00	2,50	5,0	10,0

3.3.2 Condições experimentais para ICP OES

Os parâmetros instrumentais (potência de rádio-frequência, fluxo de nebulização, fluxo de plasma, fluxo de amostra, fluxo auxiliar) foram ajustados de modo a se obter a melhor relação sinal/ruído.

Na tabela 3.3. são apresentadas as condições instrumentais utilizadas no espectrômetro de emissão atômica com plasma de argônio induzido, modelo Optima 3000 DV – Perkin Elmer.

- Tabela 3.3: Parâmetros Instrumentais do ICP OES

Nebulizador	Cross Flow
Câmara de nebulização	tipo Scott
Potência de rádio-frequência (W)	1350
Altura de observação (mm)	15
Fluxo de nebulização (L min ⁻¹)	0,85
Fluxo de plasma (L min ⁻¹)	15
Fluxo de amostra (mL min ⁻¹)	1,5
Fluxo auxiliar (L min ⁻¹)	0,5

3.3.3 Critérios para escolha dos comprimentos de onda para os elementos analisados por ICP OES

O espectrômetro utilizado permite a escolha de vários comprimentos de onda para um determinado elemento.

A escolha do comprimento de onda para os elementos estudados foi efetuada por comparação do espectro de emissão de um padrão multi-elementar contendo os minerais de interesse e o da amostra digerida.

Na tabela 3.4 estão apresentadas as condições de trabalho no ICP com as linhas escolhidas para os diferentes elementos, os pontos de correção de background (BG) e os modos de leitura.

Tabela 3.4: Condições de trabalho no ICP OES – linhas escolhidas, modos de leitura e pontos de correção de background (BG)

ELEMENTO	LINHAS ESCOLHIDAS (nm)	MODOS LEITURA	PONTOS DE BG
Ca	422,673	Radial	-0,043 / 0,047
Cr	267,716	Axial	-0,028 / 0,025
Cu	327,396	Axial	-0,040 / 0,041
Fe	259,940	Axial	-0,024 / 0,031
K	766,491	Radial	-0,108 / 0,095
Mg	280,270	Radial	-0,031 / 0,035
Mn	257,610	Axial	-0,024 / 0,032
Na	589,592	Radial	-0,110 / 0,095
P	213,618	Radial	-0,037 / -0,037
Zn	213,856	Axial	-0,017 / 0,039

3.3.4 Critérios para a escolha do procedimento de digestão da amostra

Para a determinação dos minerais por ICP OES as amostras de leite em pó foram primeiramente digeridas por via seca seguindo o método oficial de digestão para alimentos (AOAC, 1995). A seguir, foram estudados alguns métodos de digestão por via úmida em chapa elétrica e em forno de microondas. Os resultados entre os diferentes métodos de digestão foram comparados a fim de escolher o procedimento de digestão que fosse o mais rápido, simples e que empregasse uma quantidade mínima de reagentes para que posteriormente fosse aplicado à digestão de produtos lácteos.

Para verificar a exatidão dos procedimentos de digestão e assim definir a escolha sobre o método de digestão, materiais de referência certificados, NIST 8435 Whole Milk Powder e NIST 1549 Non Fat Milk Powder, foram utilizados.

3.4 DIGESTÃO POR VIA SECA

As amostras foram primeiramente digeridas por via seca, segundo o método oficial de digestão de alimentos. Estas digestões foram realizadas nas seguintes condições:

3.4.1 Amostras de leite em pó

Pesou-se cerca de 2g de amostra em cápsulas de porcelana, que então foram queimadas em bico de Bunsen. Depois as amostras foram levadas para a mufla com temperatura inicial de 100°C. A temperatura da mufla foi aumentada gradativamente a uma razão de 50°C a cada 30 minutos até atingir 450°C. As amostras permaneceram nesta temperatura por 4 horas. Após esse tempo, as amostras foram retiradas da mufla e foram tratadas com 1,0 mL de ácido nítrico concentrado, deixadas na chapa elétrica até a secura. Depois de secas as amostras retornaram para a mufla seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente. Repetiu-se este processo até que toda a matéria orgânica estivesse destruída. As cinzas resultantes foram dissolvidas com 1,0 mL de ácido clorídrico concentrado e transferidas quantitativamente para balão volumétrico de 10,0 mL com água Milli-Q. Quando necessário foram feitas diluições para que as concentrações da amostra estivessem dentro da faixa linear da curva de calibração estabelecida. Diluições foram feitas com solução de ácido clorídrico a 10%.

3.4.2 Amostras de queijo liofilizadas (minas, mussarela, prato e parmesão)

Para este tipo de amostra foram pesados cerca de 2 g de amostra em cápsula de porcelana. O procedimento foi o mesmo das amostras de leite em pó.

3.4.3 Amostra de achocolatado

Em cápsula de porcelana pipetou-se 10,0 mL da amostra previamente homogeneizada. Em seguida a amostra foi levada à estufa para secar com temperatura de cerca de 100°C. Depois de seca a amostra foi queimada em bico de Bunsen e seguiu o mesmo procedimento dado às amostras de leite em pó. As cinzas resultantes foram dissolvidas com 2,5 mL de ácido clorídrico concentrado e transferidas quantitativamente para balão volumétrico de 25,0 mL com água Milli-Q.

3.4.4 Amostra de iogurte

Pesou-se cerca de 10,0 g de amostra em cápsula de porcelana, que então foi levada à estufa para secar. Seguiu-se o mesmo procedimento da amostra de achocolatado.

3.4.5 Amostra de queijo petit suisse

Foram pesados cerca de 10,0 g de amostra em cápsula de porcelana. A digestão por via seca seguiu o mesmo procedimento descrito para a amostra de achocolatado.

3.4.6 Amostras de queijo mussarela e parmesão in natura

As amostras foram previamente trituradas em multi-processador e depois cerca de 1g de amostra foi pesada em cápsula de porcelana. Seguiu-se o mesmo procedimento da amostra de achocolatado.

3.5 DIGESTÃO VIA ÚMIDA

3.5.1 Critérios para escolha do reagente a ser utilizado na digestão via úmida

Vários são os reagentes utilizados para digerir amostras de alimentos, dentre eles o uso de ácidos oxidantes ou mistura de ácidos. Em virtude da escassez de trabalhos na literatura onde se utilizam ácido clorídrico nas digestões por via úmida de forma individual, optou-se por ele a fim de testar sua aplicabilidade. Além disso, ácido clorídrico diluído sob ebulição é utilizado em análises de margarinas, óleos vegetais e gorduras comestíveis para a determinação de elementos tóxicos (Skurikhin, 1993).

3.5.2 Digestão por via úmida em chapa elétrica

3.5.2.1 Amostras de leite em pó (integral e desnatado)

Pesou-se cerca de 1g de amostra em um erlemmeyer de 125 mL. Adicionou-se um pouco de água para dissolver o pó e a seguir foram adicionados 10,0 mL de solução de ácido clorídrico 1:1. O erlemmeyer foi colocado na chapa elétrica a 100°C – 150°C e tampado com vidro de relógio. Após o digerido começar a refluxar deixou-se a amostra por 2 horas na chapa. Ao final deste tempo, o digerido foi filtrado com papel de filtro e o volume completado com água Milli-Q para balão volumétrico de 25,0 mL. A seguir a amostra foi submetida à leitura no ICP.

3.5.2.2 Amostras de queijos liofilizados (minas, mussarela, prato e parmesão)

Para os queijos liofilizados foram utilizados cerca de 1g de amostra que foram colocados em um erlemmeyer de 125 mL e adicionados 10,0 mL de solução de ácido clorídrico 1:1. As amostras foram levadas à chapa elétrica a 100°C – 150°C e seguiram o mesmo procedimento descrito para as amostras de leite.

3.5.2.3 Amostra de achocolatado

Pipetou-se 10,0 mL de amostra em um erlemmeyer de 125 mL. Em seguida adicionou-se 10,0 mL de solução de ácido clorídrico 1:1. O erlemmeyer foi tampado com vidro de relógio e colocado na chapa a 100°C – 150°C e seguiu o mesmo procedimento descrito para as amostras de leite.

3.5.2.4 Amostra de iogurte

Em um erlemmeyer de 125 mL pesou-se cerca de 10 g de amostra e adicionou-se 10,0 mL de solução de ácido clorídrico 1:1. O procedimento dado foi o mesmo descrito anteriormente para a amostra de leite em pó.

3.5.2.5 Amostra de queijo petit suisse

Pesou-se cerca de 2 g de amostra em um erlemmeyer de 125 mL; adicionou-se um pouco de água para diluir a amostra e a seguir foram adicionados 10,0 mL de solução de ácido clorídrico 1:1, que então foi levado à chapa elétrica a 100°C – 150°C e tampado com vidro de relógio. Seguiu-se o mesmo procedimento das amostras de leite.

3.5.2.6 Amostras de queijo mussarela e parmesão in natura

Os queijos foram previamente triturados em um multi-processador.

Em erlemmeyer de 125 mL pesou-se cerca de 1g de amostra triturada e adicionou-se 10,0 mL de solução de ácido clorídrico 1:1. O erlemmeyer foi tampado com vidro de relógio e levado à chapa a 100°C – 150°C. Seguiu-se o mesmo procedimento dado às amostras de leite.

3.5.3 Estudo da concentração do ácido na solução digerida por via úmida em chapa elétrica

O meio em que está a amostra pode influenciar o sinal analítico devido às interferências físicas, levando à mudanças na eficiência de nebulização, ou devido às interferências químicas, que podem causar alteração dos mecanismos de excitação no plasma (Gouveia, 2001).

Para verificar a possibilidade da concentração do ácido da solução digerida em chapa ser diferente da concentração de ácido nos padrões da curva de calibração, podendo interferir na determinação dos elementos por ICP, foi realizado o seguinte teste:

Em béquer pequeno foram pipetados 10,0 mL da solução resultante da digestão por via úmida (em chapa elétrica), evaporados em chapa elétrica até a secura e depois transferidos quantitativamente para balão volumétrico de 10,0 mL com solução de ácido clorídrico a 10%. A solução resultante foi lida no ICP.

3.5.4 Digestão por via úmida com forno de microondas focalizado

Na digestão de amostras com o uso de microondas focalizado existem várias possibilidades na programação do equipamento, desde a opção por rampa de temperatura (tempo para atingir a temperatura desejada em cada estágio), até a variação nos volumes de ácidos e outros oxidantes e o tempo de permanência em cada estágio de temperatura.

O programa aplicado ao forno de microondas foi variado em função da otimização da temperatura inicial de trabalho, o tempo de digestão, a quantidade e a forma de adição do ácido (adição do volume total do ácido de uma única vez ou então dividido ao longo da digestão), e a diluição da amostra.

Como o forno de microondas utilizado trabalha à pressão atmosférica, não há a possibilidade de se utilizar temperaturas acima do ponto de ebulição do ácido.

Serão apresentados quatro programas de digestão via úmida com forno de microondas focalizado, sendo dois para aplicação em leite em pó integral (LI1 e LI2) e dois para aplicação em leite em pó desnatado (LD1 e LD2), os quais são mostrados nas TAB. 3.6 a 3.9, respectivamente.

As digestões por via úmida em forno de microondas foram realizadas no equipamento modelo Star 2 – CEM, com as seguintes condições:

Pesou-se cerca de 1g de amostra de leite em pó em béquer de 10 mL, que foi transferido quantitativamente para o tubo de digestão do microondas, utilizando-se água Milli-Q. A digestão foi processada conforme os programas LI1, LI2, LD1 e LD2 descritos nas tabelas 3.5 a 3.8. Os digeridos foram filtrados com papel de filtro e volume completado com água Milli-Q para balão volumétrico de 25,0 mL para os programas LI1 e LD1 e para 50,0 mL para os programas LI2 e LD2.

TABELA 3.5 Programa aplicado ao forno microondas para digestão de leite em pó integral (LI1)

ESTÁGIO	RAMPA	TEMPE- RATURA	TEMPO NA TEMP.	ADIÇÃO DE REAGENTE
	(min)	(°C)	(min)	
1	2	80	5	2,5 mL HCL conc
2	2	90	10	—
3	1	95	10	—
4	1	105	10	2,5 mL HCL conc
5	1	109	5	10 mL H ₂ O ₂ 30%
6	1	110	3	2,5 mL HCL conc

TABELA 3.6 Programa aplicado ao forno microondas para digestão de leite em pó integral (LI2)

ESTÁGIO	RAMPA	TEMPE- RATURA	TEMPO NA TEMP.	ADIÇÃO DE REAGENTE
	(min)	(°C)	(min)	
1	2	75	10	3 mL HCL conc 1 mL HNO ₃ conc
2	2	90	5	—
3	1	100	5	10 mL H ₂ O
4	1	107	5	2 mL H ₂ O ₂ 30%
5	1	109	7	10 mL H ₂ O
—	—	—	—	—

TABELA 3.7 Programa aplicado ao forno microondas para digestão de leite em pó desnatado (LD1)

ESTÁGIO	RAMPA	TEMPE- RATURA	TEMPO NA TEMP.	ADIÇÃO DE REAGENTE
	(min)	(°C)	(min)	
1	2	60	5	5 mL HCL conc
2	2	65	5	—
3	2	70	10	—
4	2	85	5	1 mL H ₂ O
5	2	95	5	—
6	1	107	10	—

TABELA 3.8: Programa aplicado ao forno microondas para digestão de leite em pó desnatado (LD2)

ESTÁGIO	RAMPA	TEMPE- RATURA	TEMPO NA TEMP.	ADIÇÃO DE REAGENTE
	(min)	(°C)	(min)	
1	2	70	5	2,5 mL HCL conc
2	2	85	5	5 mL H ₂ O 2,5 mL HCL conc
3	1	90	10	—
4	1	95	5	10 mL H ₂ O
5	1	107	10	5 mL H ₂ O
—	—	—	—	—

3.5.5 Análise dos materiais de referência certificados

Segundo a definição dada pelo Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM, 1995), material de referência certificado é um material ou substância que tem um ou mais valores de propriedades que são suficientemente homogêneos e bem estabelecidos para ser usado na calibração de um aparelho, na avaliação de um método de medição ou atribuição de valores a materiais, acompanhado por um certificado, com um ou mais valores de propriedades, e certificados por um procedimento que estabelece sua rastreabilidade à obtenção exata da unidade na qual os valores de propriedades são expressos, e cada valor certificado é acompanhado por uma incerteza para um nível de confiança estabelecido.

Materiais de referência certificados de leite, NIST 8435 Whole Milk Powder (1999) e NIST 1549 Non Fat Milk Powder (1999), foram utilizados para avaliar a exatidão da técnica de AANI e dos métodos de digestão utilizados em ICP OES (digestão por via seca, digestão por via úmida em chapa elétrica e em forno de microondas) e assim escolher o procedimento de digestão que seria aplicado aos produtos lácteos.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise de amostras de leite em pó

Nas tabelas 4.1 e 4.2 são apresentados os resultados das concentrações dos elementos determinados em leite em pó integral e desnatado por AANI e ICP OES após as diferentes digestões (digestão por via seca, via úmida em chapa elétrica e em forno de microondas focalizado).

Pela técnica de AANI não foi possível determinar os elementos cromo e cobre, em virtude de suas baixas concentrações nas amostras analisadas, e o elemento fósforo não foi possível de ser determinado pela espectrometria gama, uma vez que a espectrometria beta é a técnica mais adequada para sua determinação.

Tabela 4.1: Resultados dos elementos determinados em leite em pó integral por AANI e por ICP OES, pelos vários métodos de digestão (em mg kg⁻¹)

Elemento	Métodos de Digestão – Determinação por ICP OES (Média ±DP)				Determinação por AANI Método E (Média ± DP)
	Método A (Via seca)	Método B (Dig.via úmida em chapa elétrica)	Método C (Microondas LI1)	Método D (Microondas LI2)	
Ca	9036 ± 126 (6) ^a	8881 ± 250 (5) ^a	8826 ± 219 (3) ^a	8883 ± 235 (3) ^a	8713 ± 83 (3) ^a
Cr	0,25 ± 0,02 (6) ^a	0,24 ± 0,03 (6) ^a	0,24 ± 0,02 (3) ^a	0,19 ± 0,01 (3) ^a	*
Cu	0,31 ± 0,04 (6) ^a	0,32 ± 0,03 (6) ^a	0,38 ± 0,01 (3) ^a	0,32 ± 0,03 (3) ^a	*
Fe	2,08 ± 0,12 (6) ^a	1,95 ± 0,12 (6) ^a	2,10 ± 0,18 (3) ^a	2,08 ± 0,09 (3) ^a	2,28 ± 0,32 (3) ^a
K	11832 ± 197 (6) ^a	11951 ± 261 (6) ^a	12310 ± 1021 (3) ^a	11614 ± 282 (3) ^a	11673 ± 480 (3) ^a
Mg	772 ± 30 (6) ^a	767 ± 18 (6) ^a	755 ± 13 (3) ^a	767 ± 16 (3) ^a	752 ± 23 (3) ^a
Mn	0,23 ± 0,01 (6) ^a	0,23 ± 0,01 (6) ^a	0,23 ± 0,02 (3) ^a	0,25 ± 0,03 (3) ^a	0,26 ± 0,04 (3) ^a
Na	3265 ± 82 (6) ^a	3261 ± 67 (6) ^a	3169 ± 89 (3) ^a	3352 ± 28 (3) ^a	3176 ± 280 (3) ^a
P	7039 ± 87 (6) ^a	6969 ± 106 (6) ^a	7047 ± 120 (3) ^a	7055 ± 135 (3) ^a	na
Zn	24,5 ± 0,7 (6) ^a	24,5 ± 0,7 (6) ^a	25,2 ± 4,1 (3) ^a	24,4 ± 2,5 (3) ^a	26,7 ± 1,5 (3) ^a

a: números de determinações individuais

*: não detectado

na: não analisado

DP: desvio-padrão

Tabela 4.2: Resultados dos elementos determinados em leite em pó desnatado por AANI e ICP OES, pelos vários métodos de digestão (em mg kg^{-1})

Elemento	Métodos de Digestão – Determinação por ICP OES (Média \pm DP)				Determinação por AANI Método E (Média \pm DP)
	Método A (Dig. via seca)	Método B (Dig. via úmida em chapa elétrica)	Método C (Microondas LD1)	Método D (Microondas LD2)	
Ca	11829 \pm 276 (6) ^a	11703 \pm 77 (6) ^a	11802 \pm 212 (3) ^a	12747 \pm 685 (3) ^a	11709 \pm 934 (3) ^a
Cr	0,29 \pm 0,03 (6) ^a	0,29 \pm 0,02 (6) ^a	0,29 \pm 0,03 (3) ^a	0,24 \pm 0,04 (3) ^a	*
Cu	0,39 \pm 0,03 (6) ^a	0,40 \pm 0,03 (6) ^a	0,39 \pm 0,06 (3) ^a	0,41 \pm 0,02 (3) ^a	*
Fe	2,24 \pm 0,09 (6) ^a	2,19 \pm 0,10 (6) ^a	2,24 \pm 0,47 (3) ^a	1,97 \pm 0,05 (3) ^a	2,48 \pm 0,16 (3) ^a
K	15471 \pm 121 (6) ^a	15385 \pm 157 (6) ^a	15531 \pm 177 (3) ^a	15721 \pm 515 (3) ^a	15740 \pm 931 (3) ^a
Mg	1032 \pm 20 (6) ^a	1050 \pm 13 (6) ^a	1049 \pm 22 (3) ^a	1075 \pm 18 (3) ^a	1044 \pm 46 (3) ^a
Mn	0,29 \pm 0,03 (6) ^a	0,30 \pm 0,01 (6) ^a	0,33 \pm 0,01 (3) ^a	0,33 \pm 0,04 (3) ^a	0,32 \pm 0,04 (3) ^a
Na	4613 \pm 119 (6) ^a	4571 \pm 36 (6) ^a	4576 \pm 33 (3) ^a	4626 \pm 189 (3) ^a	4559 \pm 4 (3) ^a
P	9154 \pm 70 (6) ^a	9126 \pm 154 (6) ^a	9345 \pm 36 (3) ^a	9008 \pm 160 (3) ^a	na
Zn	31,1 \pm 1,1 (6) ^a	31,3 \pm 0,9 (6) ^a	31,3 \pm 1,2 (3) ^a	30,2 \pm 1,1 (3) ^a	34,3 \pm 3,4 (3) ^a

a: números de determinações individuais

*: não detectado

na: não analisado

DP: desvio-padrão

Os resultados obtidos pela técnica de ICP OES nas amostras tratadas pelos métodos de digestão via úmida em chapa elétrica e microondas focalizado (programas LI1 e LI2 para leite em pó integral; programas LD1 e LD2 para leite em pó desnatado) foram comparados com os resultados obtidos pelo método de digestão via seca, que é o método oficial para digestão de alimentos (AOAC, 1995) e também com a técnica de AANI, que não necessita de digestão de amostra.

Para verificar se as médias obtidas entre os diferentes procedimentos de dissolução de amostra poderiam ser consideradas iguais, foi aplicado o teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. Nas tabelas 4.3 e 4.4 são apresentados os resultados do teste estatístico para comparações entre as médias das amostras de leite em pó integral e desnatado, pelos diferentes métodos de dissolução e AANI. Os valores para q calculado e q crítico do teste de Tukey-Kramer são apresentados nas tabelas do apêndice.

Tabela 4.3: Comparação entre as médias obtidas para a amostra de leite em pó integral pela técnica de AANI e ICP OES após os diferentes métodos de digestão, aplicando o teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer

Leite em pó integral instantâneo							
Elemento	Métodos A x B	Métodos A x C	Métodos A x D	Métodos A x E	Métodos E x B	Métodos E x C	Métodos E x D
Ca	+	+	+	+	+	+	+
Cr	+	+	-	*	*	*	*
Cu	+	-	+	*	*	*	*
Fe	+	+	+	+	+	+	+
K	+	+	+	+	+	+	+
Mg	+	+	+	+	+	+	+
Mn	+	+	+	+	+	+	+
Na	+	+	+	+	+	+	+
P	+	+	+	na	na	na	na
Zn	+	+	+	+	+	+	+

A: Digestão via seca; B: Digestão via úmida em chapa elétrica; C: Digestão via úmida em forno de microondas, programa LI1; D: Digestão via úmida em forno de microondas, programa LI2; E: Técnica de AANI

+: aceita (as médias podem ser consideradas iguais com o nível de significância de 95% considerados)

-: rejeita (as médias não são consideradas iguais com o nível de significância de 95% considerados)

*: não detectado na: não analisado

Tabela 4.4: Comparação entre as médias obtidas para a amostra de leite em pó desnatado pela técnica de AANI e ICP OES após os diferentes métodos de digestão, aplicando o teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer

Leite em pó desnatado instantâneo							
Elemento	Métodos A x B	Métodos A x C	Métodos A x D	Métodos A x E	Métodos E x B	Métodos E x C	Métodos E x D
Ca	+	+	+	+	+	+	+
Cr	+	+	+	*	*	*	*
Cu	+	+	+	*	*	*	*
Fe	+	+	+	+	+	+	+
K	+	+	+	+	+	+	+
Mg	+	+	+	+	+	+	+
Mn	+	+	+	+	+	+	+
Na	+	+	+	+	+	+	+
P	+	+	+	na	na	na	na
Zn	+	+	+	+	+	+	-

+: aceita (as médias podem ser consideradas iguais com o nível de significância de 95% considerados)

-: rejeita (as médias não são consideradas iguais com o nível de significância de 95% considerados)

*: não detectado na: não analisado

Com a digestão por via seca conseguiu-se a destruição total da matéria orgânica.

Na digestão por via úmida em chapa elétrica com o uso de ácido clorídrico, observou-se que a solução obtida após a filtração apresentava coloração de castanho claro a escuro, dependendo do tipo de amostra. Se a leitura não for realizada imediatamente após o preparo, ocorre decantação de um precipitado fino, contudo isso não afetou o resultado final. O método é bastante versátil, pois as leituras não precisam ser feitas necessariamente no dia da preparação.

A digestão realizada em forno de microondas resultou em soluções de coloração de castanho claro (programas LD1 e LI1) a escuro (programa LD2). No programa LI2, onde foi utilizada a mistura de ácido clorídrico e nítrico, a solução apresentou coloração amarela clara com suspensões de gordura, dependendo da amostra.

Para a amostra de leite em pó integral, verificamos que as concentrações médias e desvios-padrão obtidos para os elementos analisados foram bastante concordantes entre os diferentes métodos de dissolução estudados e a técnica de AANI (tabela 4.1). Verificamos também que para elementos como ferro, potássio, manganês e zinco, as digestões realizadas em forno de microondas resultaram em um desvio-padrão maior do que para as outras técnicas aplicadas. Isso provavelmente foi causado por refluxos, que ocorriam durante a digestão da amostra no forno de microondas.

Pelo resultado do teste estatístico apresentado na tabela 4.3, as concentrações obtidas de cromo, após a digestão por via seca e via úmida em microondas utilizando o programa LI2, foram consideradas diferentes, pelos mesmos motivos expostos acima. Para cobre verificou-se diferença entre a concentração obtida pela digestão via seca e via úmida em forno de microondas utilizando o programa LI1. Comparando-se os resultados obtidos para os demais elementos analisados, não se verificaram diferenças nas concentrações médias obtidas entre um método cuja matéria orgânica foi totalmente destruída (digestão por via seca) e os outros com destruição parcial da matéria orgânica (digestões por via úmida em chapa elétrica ou forno de microondas) e um que não necessita de dissolução da amostra (AANI).

Para leite em pó desnatado, verificamos que as concentrações para os elementos determinados após a digestão da amostra por via úmida em chapa elétrica ou em forno de microondas foram consideradas estatisticamente iguais às obtidas para a amostra digerida por

via seca ou analisada por AANI ao nível de significância de 95%, como mostrado na tabela 4.4.

Os valores dos desvios-padrão obtidos para os elementos determinados em leite em pó desnatado após as digestões por via úmida em forno de microondas foram maiores que os valores dos desvios obtidos após a digestão via úmida em chapa elétrica para a mesma amostra, o que pode ser explicado pela ocorrência de refluxos durante a digestão no forno causados por pontos de super aquecimento.

GOUVEIA et al. (2001) relataram que concentrações elevadas de carbono poderiam causar interferência nas medidas do ICP OES, devido aos efeitos de auto-absorção. As digestões por via úmida resultaram em digestões parciais da fração orgânica da amostra, mesmo assim não foi verificado este tipo de interferência, já que as concentrações obtidas para os elementos determinados por via seca e via úmida foram bastante concordantes.

Como os métodos de digestão por via úmida, realizada em chapa elétrica e forno de microondas, mostraram-se adequados para a análise de minerais e elementos traço em amostras de leite em pó integral e desnatado, procedeu-se à verificação da exatidão com aplicação destes métodos aos materiais de referência certificados.

4.2 Análise dos materiais de referência certificados

Para verificar a exatidão dos métodos de dissolução de amostra estudados (via seca, via úmida em chapa elétrica, via úmida em forno de microondas focalizado) e AANI, foram utilizados dois materiais de referência certificados (NIST 8435 Whole Milk Powder e NIST 1549 Non Fat Milk Powder). As concentrações obtidas são apresentadas nas tabelas 4.5 e 4.7.

Os resultados obtidos entre os diferentes métodos de digestão e a AANI para o material de referência certificado NIST 8435 Whole Milk Powder (tabela. 4.5) foram comparados com os valores de referência certificados através do teste estatístico de Dunnett e são apresentados na tabela 4.6.

Tabela 4.5: Resultados dos elementos determinados em NIST8435 por ICP OES, pelos vários métodos de digestão e por AANI (em mg kg⁻¹)

Ele/o	Métodos de Digestão				Determinação por AANI Método E (Média ± DP)	Valor Certificado
	Determinação por ICP OES (Média ± DP)					
	Método A (Via seca)	Método B (Via úmida em chapa elétrica)	Método C (MicroondasLI1)	Método D (MicroondasLI2)		
Ca	9331 ± 207 (6) ^a	9209 ± 147 (6) ^a	9384 ± 535 (3) ^a	8270 ± 177 (3) ^a	9097 ± 192 (6) ^a	9220 ± 490
Cu	0,44 ± 0,05 (6) ^a	0,40 ± 0,04 (6) ^a	0,43 ± 0,06 (3) ^a	0,44 ± 0,05 (3) ^a	*	0,46 ± 0,08
Fe	1,87 ± 0,13 (6) ^a	1,95 ± 0,43 (6) ^a	2,42 ± 0,23 (3) ^a	*	1,88 ± 0,14 (6) ^a	1,8 ± 1,1
K	13844 ± 263 (6) ^a	13484 ± 288 (6) ^a	13591 ± 965 (3) ^a	12071 ± 266 (3) ^a	13410 ± 230 (6) ^a	13630 ± 470
Mg	813 ± 27 (6) ^a	794 ± 17 (6) ^a	705 ± 33 (3) ^a	698 ± 16 (3) ^a	798 ± 13 (6) ^a	814 ± 76
Mn	0,17 ± 0,02 (6) ^a	0,16 ± 0,01 (6) ^a	0,15 ± 0,01 (3) ^a	0,15 ± 0,02 (3) ^a	0,20 ± 0,04 (6) ^a	0,17 ± 0,05
Na	3670 ± 98 (6) ^a	3555 ± 54 (6) ^a	3881 ± 320 (3) ^a	3332 ± 136 (3) ^a	3559 ± 99 (6) ^a	3560 ± 400
P	7871 ± 135 (6) ^a	7632 ± 228 (6) ^a	7245 ± 125 (3) ^a	6724 ± 94 (3) ^a	na	7800 ± 490
Zn	27,7 ± 2,0 (6) ^a	26,7 ± 2,0 (6) ^a	21,8 ± 1,1 (3) ^a	29,6 ± 2,6 (3) ^a	29,0 ± 1,9 (6) ^a	28,0 ± 3,1

a: números de determinações individuais na: não analisado *: não-detectado
DP: desvio-padrão

Tabela 4.6: Comparação entre as médias obtidas para o material de referência certificado NIST 8435 por ICP OES, pelos diferentes métodos de digestão e a técnica de AANI aplicando o teste de Dunnett

NIST 8435 – Whole Milk Powder					
Elemento	V.certificado x Método A	V.certificado x Método B	V.certificado x Método C	V.certificado x Método D	V.certificado x Método E
Ca	+	+	+	-	+
Cu	+	+	+	+	*
Fe	+	+	+	*	+
K	+	+	+	-	+
Mg	+	+	-	-	+
Mn	+	+	+	+	+
Na	+	+	+	+	+
P	+	+	-	-	na
Zn	+	+	-	+	+

A: Digestão via seca; B: Digestão via úmida em chapa elétrica; C: Digestão via úmida em forno de microondas, programa LI1; D: Digestão via úmida em forno de microondas, programa LI2; E: Técnica de AANI

+: aceita (as médias podem ser consideradas iguais com o nível de significância de 95% considerados)

-: rejeita (as médias não são consideradas iguais com o nível de significância de 95% considerados)

na: não analisado *: não-detectado

A comparação das concentrações obtidas entre AANI e os diferentes métodos de digestão, com os valores certificados para o material de referência NIST 1549 – Non Fat Milk Powder foi feita aplicando-se o teste estatístico de comparações múltiplas de Dunnett e são apresentados na tabela 4.8.

Tabela 4.7: Resultados dos elementos determinados em NIST1549 por ICP OES, pelos vários métodos de digestão e por AANI (em mg kg⁻¹)

Ele/o	Métodos de Digestão Determinação por ICP OES (Média ± DP)				Determinação por AANI Método E (Média ± DP)	Valor Certificado
	Método A (Via seca)	Método B (Via úmida em chapa elétrica)	Método C (Microondas LD1)	Método D (Microondas LD2)		
Ca	13128±355(4) ^a	13122±373(5) ^a	13646±133(3) ^a	11978±123 (3) ^a	13218 ±274(6) ^a	13000 ± 500
Cu	0,66±0,07 (5) ^a	0,64±0,05 (6) ^a	0,45±0,03 (3) ^a	0,50±0,06 (3) ^a	*	0,7 ± 0,1
Fe	1,84±0,09 (4) ^a	1,75±0,29 (5) ^a	2,15±0,18 (3) ^a	2,60±0,79 (3) ^a	1,79±0,34(5) ^a	1,78 ± 0,1
K	16881±495(5) ^a	16807±721(6) ^a	18248±16(3) ^a	15958±143(3) ^a	16034±443 (5) ^a	16900 ± 300
Mg	1149 ± 48 (6) ^a	1103 ± 10 (6) ^a	1002 ± 7 (3) ^a	1047 ± 23 (3) ^a	1205 ± 22 (5) ^a	1200 ± 30
Mn	0,21±0,02 (5) ^a	0,22±0,02 (6) ^a	0,13 ± 0,01 (3) ^a	0,15±0,01 (3) ^a	0,22±0,03(4) ^a	0,26±0,06
Na	5139± 232 (4) ^a	4990± 242 (6) ^a	5580 ± 45 (3) ^a	4742 ± 46 (3) ^a	4975 ± 144 (6) ^a	4970 ± 100
P	10603±374(6) ^a	10117±138(4) ^a	10360 ± 127 (3) ^a	9912 ± 249 (3) ^a	na	10600 ± 200
Zn	40,5 ± 0,9 (6) ^a	40,4 ± 2,8 (6) ^a	45,0 ± 9,7 (3) ^a	46,6 ± 0,1 (3) ^a	43,9±2,6 (5) ^a	46,1 ± 2,2

a: números de determinações individuais

*: não detectado

na: não analisado

Tabela 4.8: Comparação entre as médias obtidas para o material de referência certificado NIST 1549 pela técnica de AANI e ICP OES, aplicando o teste de Dunnett

NIST 1549 – Non Fat Milk Powder					
Elemento	V.certificado x Método A	V.certificado x Método B	V.certificado x Método C	V.certificado x Método D	V.certificado x Método E
Ca	+	+	+	-	+
Cu	+	+	-	-	*
Fe	+	+	+	-	+
K	+	+	-	+	+
Mg	+	-	-	-	+
Mn	+	+	-	-	+
Na	+	+	-	+	+
P	+	+	+	-	na
Zn	+	+	+	+	+

A: Digestão via seca; B: Digestão via úmida em chapa elétrica; C: Digestão em forno de microondas-LD1; D: Digestão em forno de microondas-LD2; E: Técnica de AANI

+: aceita (as médias podem ser consideradas iguais com o nível de significância de 95% considerados)

-: rejeita (as médias não são consideradas iguais com o nível de significância de 95% considerados)

na: não analisado

*: não detectado

Pelos resultados das comparações estatísticas dos materiais de referência certificados NIST 8435 e NIST 1549, apresentados nas tabelas 4.6 e 4.8, observamos que as concentrações obtidas após a digestão por via seca, via úmida em chapa elétrica e a técnica de AANI foram bastante concordantes com os valores certificados. Para as digestões realizadas em forno de microondas, encontramos alguns valores não concordantes com os valores certificados, que podem ser justificados pelos refluxos ocorridos durante a digestão da amostra, levando conseqüentemente à perda dos analitos. O mesmo problema foi relatado por EMMETT (1988), que recomendou cuidados com a elevada temperatura durante a digestão de amostras de leite devido à formação de espuma, que é difícil de ser incorporada à solução do digerido.

Para uma melhor visualização dos resultados obtidos para os materiais de referência, estes são apresentados nas figuras 4.1 e 4.2, utilizando-se o critério do Z-score (BODE, 1997). Valores de z entre +/- 3, significam que o resultado do material de referência deve estar dentro do valor verdadeiro (ou aceito) ao nível de significância de 99%.

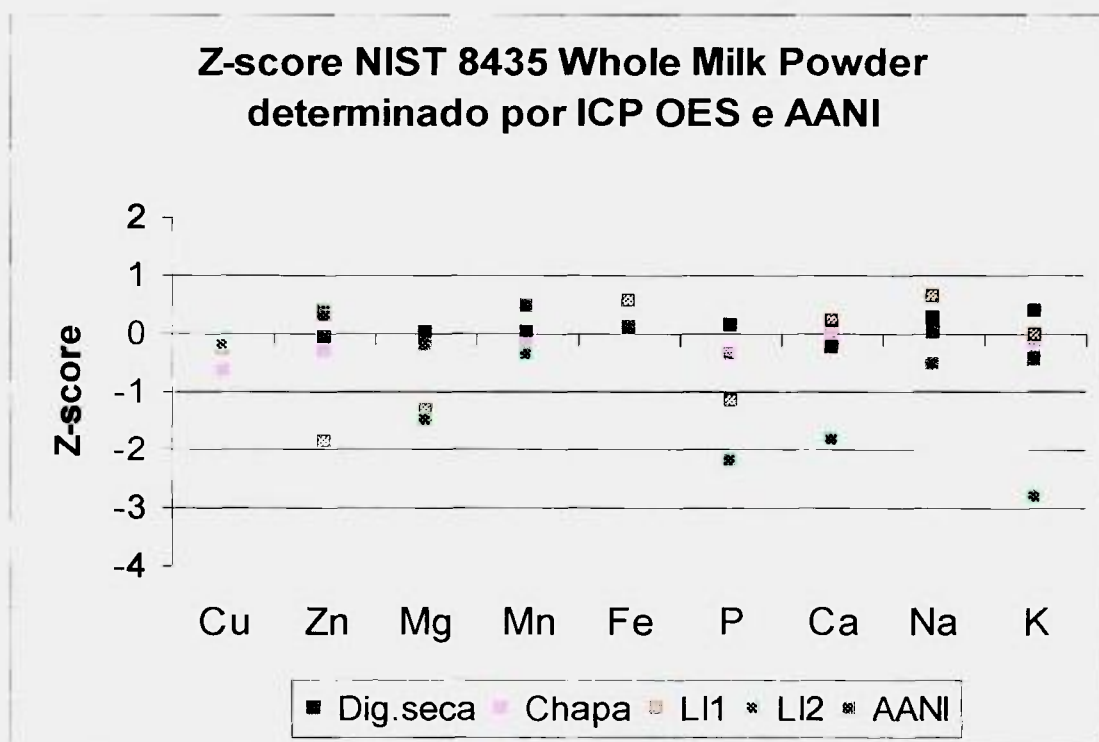


FIGURA 4.1: Z-score para NIST 8435 Whole Milk Powder determinado para os diferentes métodos de digestão de amostra por ICP OES e AANI.

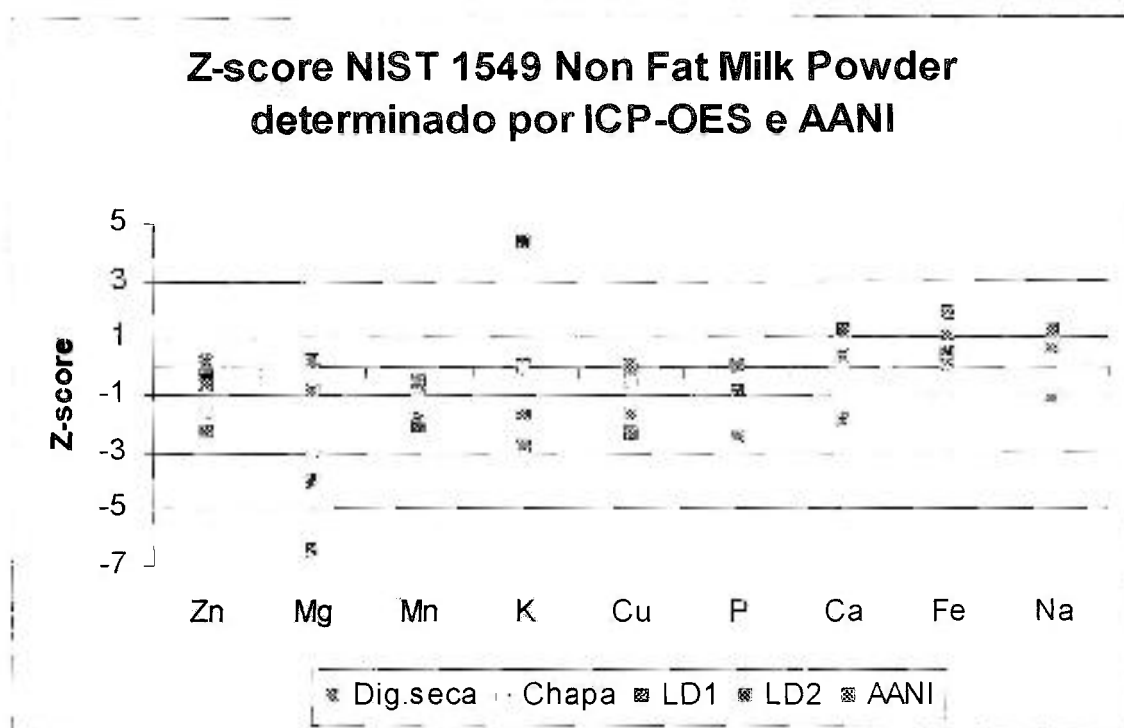


FIGURA 4.2: Z-score para NIST 1549 Non Fat Milk Powder determinado por ICP OES e AANI.

Pelas figuras de Z-score podemos observar que, para praticamente todos os valores obtidos por ICP OES e AANI os valores de z encontravam-se no intervalo entre ± 3 , o que significa que as concentrações obtidas para todos os elementos analisados encontravam-se dentro da faixa do valor certificado ao nível de significância de 99%, exceto para magnésio e potássio (no caso do NIST 1549) determinados após digestão por via úmida em microondas.

Como os resultados obtidos para os materiais de referência digeridos por via úmida em chapa elétrica foram bastante concordantes com os valores certificados para os elementos analisados, este método de dissolução de amostra foi aplicado aos produtos lácteos. Foi dada preferência pela escolha desta técnica de digestão para análise de minerais em produtos lácteos, pois este método poderá ser aplicado em laboratórios que não dispõem de um forno de microondas. Além disso, o forno utilizado (Star 2-CEM) permite somente a digestão de duas amostras de cada vez, restringindo assim o seu uso.

4.3 Análise dos produtos lácteos

As amostras de achocolatado, iogurte e queijos (mussarela, minas, prato, parmesão e petit suisse) foram digeridos por via seca e por via úmida com ácido clorídrico.

Nas tabelas 4.9 a 4.15 são apresentados os resultados dos elementos determinados nas amostras de queijo mussarela e minas liofilizados, prato e parmesão liofilizados, achocolatado e iogurte e queijo petit suisse respectivamente, por ICP OES após digestão por via seca e digestão via úmida em chapa elétrica, e por AANI. São apresentadas também as comparações das médias obtidas empregando o teste estatístico de Tukey-Kramer.

Tabela 4.9: Resultados dos elementos determinados em amostras de queijo mussarela e minas por AANI e por ICP OES, pelos métodos de digestão por via seca e via úmida em chapa elétrica (em mg kg^{-1})

Ele/o	Queijo Mussarela			Queijo Minas		
	Método A ICP / Via seca (Média \pm DP)	Método B ICP/ Dig. úmida (Média \pm DP)	Método C AANI (Média \pm DP)	Método A ICP / Via seca (Média \pm DP)	Método B ICP/ Dig. úmida (Média \pm DP)	Método C AANI (Média \pm DP)
Ca	7004 \pm 169 (3) ^a	6477 \pm 273 (3) ^a	7046 \pm 514(3) ^a	4483 \pm 96 (3) ^a	4454 \pm 60 (3) ^a	5253 \pm 96(3) ^a
Cr	0,17 \pm 0,04 (3) ^a	0,10 \pm 0,01 (3) ^a	*	0,14 \pm 0,02 (3) ^a	0,17 \pm 0,07 (3) ^a	*
Cu	0,43 \pm 0,02 (3) ^a	0,35 \pm 0,01 (3) ^a	*	0,32 \pm 0,02 (3) ^a	0,27 \pm 0,05 (3) ^a	*
Fe	2,37 \pm 0,21 (3) ^a	2,25 \pm 0,01 (3) ^a	2,29 \pm 0,24 (3)	7,74 \pm 0,09 (3) ^a	7,31 \pm 0,60 (3) ^a	7,42 \pm 0,15 (3)
K	746 \pm 67 (3) ^a	754 \pm 8 (3) ^a	716 \pm 48 (3) ^a	994 \pm 6 (3) ^a	895 \pm 20 (3) ^a	997 \pm 65 (3) ^a
Mg	220 \pm 2 (3) ^a	222 \pm 2 (3) ^a	260 \pm 10 (3) ^a	668 \pm 45 (3) ^a	599 \pm 8 (3) ^a	681 \pm 34 (3) ^a
Mn	0,29 \pm 0,03 (3) ^a	0,30 \pm 0,01 (3) ^a	0,33 \pm 0,03(3) ^a	0,30 \pm 0,03 (3) ^a	0,35 \pm 0,01 (3) ^a	0,31 \pm 0,01 (3)
Na	4462 \pm 332 (3) ^a	4180 \pm 194 (3) ^a	4222 \pm 133(3) ^a	3121 \pm 94 (3) ^a	3124 \pm 36 (3) ^a	3074 \pm 121(3) ^a
P	4711 \pm 26 (3) ^a	4414 \pm 133 (3) ^a	na	2536 \pm 49 (3) ^a	2457 \pm 53 (3) ^a	na
Zn	37,1 \pm 1,4 (3) ^a	36,9 \pm 1,1 (3) ^a	35,6 \pm 0,9 (3)	6,90 \pm 0,18 (3) ^a	7,52 \pm 0,76 (3) ^a	6,42 \pm 0,24 (3)

a: número de determinações individuais

*: não detectado na: não analisado

DP: desvio-padrão

Tabela 4.10: Comparação entre as médias obtidas para as amostras de queijo mussarela e minas pela técnica de AANI e ICP OES, com diferentes métodos de digestão, aplicando o teste de Tukey-Kramer

Elemento	Queijo Mussarela			Queijo Minas		
	Métodos A x B	Métodos A x C	Métodos B x C	Métodos A x B	Métodos A x C	Métodos B x C
Ca	+	+	+	+	-	-
Cr [#]	-	*	*	+	*	*
Cu [#]	-	*	*	+	*	*
Fe	+	+	+	+	+	+
K	+	+	+	+	+	+
Mg	+	+	+	+	+	+
Mn	+	+	+	-	+	+
Na	+	+	+	+	+	+
P	-	na	na	+	na	na
Zn	+	+	+	+	+	+

A: Digestão via seca; B: Digestão via úmida em chapa elétrica; C: Técnica de AANI

+: aceita (as médias podem ser consideradas iguais com o nível de significância de 95% considerados)

-: rejeita (as médias não são consideradas iguais com o nível de significância de 95% considerados)

*: não detectado

na: não analisado

#: comparação feita pelo teste t (para dados não emparelhados)

Tabela 4.11: Resultados dos elementos determinados em amostras de queijo prato e parmesão por AANI e por ICP OES, pelos métodos de digestão por via seca e úmida em chapa elétrica (em mg kg⁻¹)

Ele/o	Queijo Prato			Queijo Parmesão		
	Método A ICP / Via seca (Média ± DP)	Método B ICP/ Dig. úmida (Média ± DP)	Método C AANI (Média ± DP)	Método A ICP / Via seca (Média ± DP)	Método B ICP/ Dig. úmida (Média ± DP)	Método C AANI (Média ± DP)
Ca	7794 ± 150 (3) ^a	7671±266(3) ^a	8307±444(3) ^a	10551±226 (3) ^a	10509±151 (3) ^a	10632±457(3) ^a
Cr	0.19 ± 0.03 (3) ^a	0.21 ± 0.02 (3) ^a	*	0.29 ± 0.04 (3) ^a	0.29 ± 0.02 (3) ^a	*
Cu	0.45 ± 0,03 (3) ^a	0.52 ± 0.04 (3) ^a	*	0.31 ± 0.03 (3) ^a	0.29 ± 0.03 (3) ^a	*
Fe	2.33 ± 0.17 (3) ^a	2.30 ± 0.10 (3) ^a	2.64±0.19 (3)	2.29 ± 0.89 (3) ^a	2.43 ± 0.48 (3) ^a	2.14±0.22 (3)
K	878 ± 50 (3) ^a	839 ± 43 (3) ^a	921 ± 76 (3) ^a	989 ± 38 (3) ^a	881± 5 (3) ^a	948 ± 88 (3) ^a
Mg	282 ± 7 (3) ^a	268 ± 11 (3) ^a	260 ± 10 (3) ^a	385 ± 9 (3) ^a	395 ± 10 (3) ^a	349 ± 30 (3) ^a
Mn	0.24 ± 0.02 (3) ^a	0.24 ± 0.01 (3) ^a	0.29±0.04(3) ^a	0.26 ± 0.07 (5) ^a	0.28 ± 0.01 (3) ^a	0.26±0.02 (3)
Na	5173 ± 120 (3) ^a	5238 ± 174 (3) ^a	5068±54(3) ^a	10362±519 (3) ^a	10486±126 (3) ^a	10388±348(3) ^a
P	4835 ± 96 (3) ^a	4663 ± 182 (3) ^a	na	6732 ± 153 (3) ^a	6657 ± 85 (3) ^a	na
Zn	32.2 ± 1.6 (3) ^a	33.2 ± 2.1 (3) ^a	32.5 ± 0.8 (3)	48.4 ± 1.2 (3) ^a	49.6 ± 1.8 (3) ^a	49.0 ± 1.2 (3)

a: número de determinações individuais

na: não analisado *: não detectado

DP: desvio-padrão

Tabela 4.12: Comparação entre as médias obtidas para as amostras de queijo prato e parmesão pela técnica de AANI e ICP OES, com diferentes métodos de digestão, aplicando o teste de Tukey-Kramer

Elemento	Queijo Prato			Queijo Parmesão		
	Métodos A x B	Métodos A x C	Métodos B x C	Métodos A x B	Métodos A x C	Métodos B x C
Ca	+	+	+	+	+	+
Cr [#]	+	*	*	+	*	*
Cu [#]	-	*	*	+	*	*
Fe	+	+	+	+	+	+
K	+	+	+	+	+	+
Mg	+	+	+	+	+	+
Mn	+	+	+	+	+	+
Na	+	+	+	+	+	+
P	+	na	na	+	na	na
Zn	+	+	+	+	+	+

A: Digestão via seca; B: Digestão via úmida em chapa elétrica; C: Técnica de AANI

+: aceita (as médias podem ser consideradas iguais com o nível de significância de 95% considerados)

-: rejeita (as médias não são consideradas iguais com o nível de significância de 95% considerados)

na: não analisado *: não detectado

#: comparação feita pelo teste t (para dados não emparelhados)

Tabela 4.13: Resultados e comparação das médias obtidas para os elementos determinados na amostra de queijo petit suisse por AANI e por ICP OES (digestão por via seca e úmida em chapa elétrica) (em mg kg⁻¹)

Elemento	Determinação por ICP OES (Média ± DP)		Método C (Técnica de AANI) (Média ± DP)	Comparação		
	Método A (Dig. via seca)	Método B (Dig. via úmida Chapa elétrica)		Métodos A x B	Métodos A x C	Métodos B x C
Ca	2136 ± 30 (3) ^a	2153 ± 70 (3) ^a	2181 ± 39 (3) ^a	+	+	+
Cr	0.07 ± 0.01 (3) ^a	0.07 ± 0.01 (3) ^a	*	+	*	*
Cu	0.19 ± 0.03 (3) ^a	0.22 ± 0.01 (3) ^a	*	+	*	*
Fe	30.1 ± 1.2 (3) ^a	29.1 ± 0.1 (3) ^a	32.2 ± 0.4 (3) ^a	+	+	-
K	936 ± 6 (3) ^a	980 ± 6 (3) ^a	957 ± 51 (3) ^a	+	+	+
Mg	77.0 ± 3.0 (3) ^a	74.5 ± 1.3 (3) ^a	74.6 ± 5.9 (3) ^a	+	+	+
Mn	0.36 ± 0.01 (3) ^a	0.35 ± 0.02 (3) ^a	0.36 ± 0.03 (3) ^a	+	+	+
Na	265 ± 14 (3) ^a	283 ± 8 (3) ^a	283 ± 2 (3) ^a	+	+	+
P	1557 ± 41 (3) ^a	1410 ± 16 (3) ^a	na	-	na	na
Zn	3.16 ± 0.08 (3) ^a	3.15 ± 0.23 (3) ^a	3.38 ± 0.13 (3) ^a	+	+	+

A: Digestão via seca; B: Digestão via úmida em chapa elétrica; C: Técnica de AANI

a: números de determinações individuais

na: não analisado

*: não detectado

DP: desvio-padrão

Para as amostras de queijo as concentrações dos elementos obtidas após a digestão por via úmida foram concordantes com as concentrações determinadas após digestão por via seca, para praticamente todos os elementos analisados. Exceção foi verificada para a amostra de queijo mussarela e petit suisse cujo teor de fósforo obtido após a digestão por via úmida foi menor que a concentração obtida por via seca (tabelas 4.9 e 4.13). Segundo a literatura (HURLEY, 2002; JENSEN, 1995), isto pode ser devido à associação deste elemento com a caseína, dificultando sua liberação da matriz.

Comparando-se os resultados obtidos para cálcio entre as diferentes matrizes analisadas, verificamos que a maior variação na concentração deste elemento determinado por digestão via úmida em relação à concentração obtida por digestão via seca foi mais pronunciada para a amostra de queijo mussarela. Para as demais amostras, a variação nas concentrações de cálcio não foi superior a 2% pela digestão via seca e via úmida em chapa elétrica. A explicação para este fato pode ser devida à forte associação de cálcio com a caseína, devido ao maior conteúdo de gordura presente na amostra de queijo mussarela em relação às demais amostras analisadas. Isso foi verificado no trabalho de De LA FUENTE & JUÁREZ (1995b) que relataram que 2/3 do cálcio estão associados com as micelas da caseína, que na presença de gordura causa dificuldades na determinação deste elemento em amostras de leite.

Pode-se supor uma relação entre o teor de gordura e a associação de um elemento, como o cálcio, com a caseína, de forma mais intensa, dificultando a liberação do elemento da matriz, levando conseqüentemente a baixas recuperações.

Para a determinação de magnésio não foram verificadas grandes variações entre as concentrações obtidas pelos métodos de digestão, pois somente 1/3 deste elemento está ligado à caseína, além disso, encontra-se em menor concentração em relação ao cálcio (DE LA FUENTE & JUÁREZ, 1995b).

Tabela 4.14: Resultados dos elementos determinados em amostras de achocolatado e iogurte por AANI e por ICP OES, pelos métodos de digestão por via seca e úmida em chapa elétrica (em mg kg⁻¹)

Ele/o	Achocolatado			Iogurte		
	Método A ICP / Via seca (Média ± DP)	Método B ICP/ Dig. úmida (Média ± DP)	Método C AANI (Média ± DP)	Método A ICP / Via seca (Média ± DP)	Método B ICP/ Dig. úmida (Média ± DP)	Método C AANI (Média ± DP)
Ca	715 ± 9 (3) ^a	723 ± 18 (3) ^a	731 ± 14 (3) ^a	934 ± 11 (3) ^a	927 ± 24 (3) ^a	923 ± 6 (3) ^a
Cr	0,06 ± 0,01(3) ^a	0,06 ± 0,02 (3) ^a	*	0,04 ± 0,01 (3) ^a	0,04 ± 0,01 (3) ^a	*
Cu	0,54 ± 0,03(3) ^a	0,52 ± 0,02 (3) ^a	*	0,07 ± 0,01 (3) ^a	0,05 ± 0,01 (3) ^a	*
Fe	5,44 ± 0,09(3) ^a	5,48 ± 0,05 (3) ^a	5,33 ± 0,34 (3)	1,97 ± 0,40 (3) ^a	1,94 ± 0,10 (3) ^a	1,93 ± 0,34 (3)
K	1758 ± 29(3) ^a	1756 ± 10 (3) ^a	1760 ± 136 (3) ^a	1396 ± 24 (3) ^a	1358 ± 11 (3) ^a	1366 ± 26 (3) ^a
Mg	151 ± 3(3) ^a	146 ± 1 (3) ^a	155 ± 5 (3) ^a	81,8 ± 4,9 (3) ^a	81,3 ± 1,1 (3) ^a	83,4 ± 2,1(3) ^a
Mn	0,63 ± 0,03(3) ^a	0,63 ± 0,02 (3) ^a	0,63 ± 0,12(3) ^a	0,30 ± 0,03 (3) ^a	0,28 ± 0,01 (3) ^a	0,28 ± 0,04 (3)
Na	661 ± 18(3) ^a	655 ± 32 (3) ^a	660 ± 12 (3) ^a	330 ± 10 (3) ^a	346 ± 11 (3) ^a	357 ± 2 (3) ^a
P	640 ± 10(3) ^a	639 ± 7 (3) ^a	na	692 ± 45 (3) ^a	700 ± 7 (3) ^a	na
Zn	3,00 ± 0,18(3) ^a	3,02 ± 0,07 (3) ^a	2,93 ± 0,12 (3)	3,29 ± 0,53 (3) ^a	3,27 ± 0,20 (3) ^a	3,28 ± 0,05 (3)

a: número de determinações individuais na: não analisado *: não detectado DP: desvio-padrão

Tabela 4.15: Comparação entre as médias obtidas para as amostras de achocolatado e iogurte pela técnica de AANI e pelos diferentes métodos de digestão determinados por ICP OES aplicando o Teste de Tukey-Kramer

Elemento	Achocolatado			Iogurte		
	Métodos A x B	Métodos A x C	Métodos B x C	Métodos A x B	Métodos A x C	Métodos B x C
Ca	+	+	+	+	+	+
Cr	+	*	*	+	*	*
Cu	+	*	*	+	*	*
Fe	+	+	+	+	+	+
K	+	+	+	+	+	+
Mg	+	+	+	+	+	+
Mn	+	+	+	+	+	+
Na	+	+	+	+	+	+
P	+	na	na	+	na	na
Zn	+	+	+	+	+	+

A: Digestão via seca; B: Digestão via úmida em chapa elétrica; C: Técnica de AANI

+: aceita (as médias podem ser consideradas iguais ao nível de significância de 95 %)

-: rejeita (as médias não são consideradas iguais ao nível de significância de 95%)

na: não analisado *: não detectado

Pelos resultados dos testes estatísticos, verificou-se concordância entre os resultados obtidos para todos os elementos determinados em achocolatado e iogurte após as digestões por via seca, via úmida em chapa elétrica e a técnica de AANI.

Verificamos que os valores de desvios-padrão obtidos pelo método de digestão via úmida em chapa elétrica foram comparativamente iguais e até menores para alguns elementos, como Ca, K, Mn, Na, P nas amostras de queijo parmesão, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P e Zn em

achocolatado, Fe, K, Mg, Mn, e P em iogurte, Cu, Fe, Mg, e P em queijo petit suisse, em relação aos métodos de digestão por via seca e AANI.

4.4 Aplicação do método de digestão via úmida com ácido clorídrico em amostras de queijo in natura

As concentrações obtidas para os elementos determinados após as digestões por via úmida e via seca foram bastante concordantes em amostras liofilizadas de queijo (tabelas 4.9 e 4.11). Muitos laboratórios analíticos utilizam amostras liofilizadas, preferencialmente às amostras in natura, para facilitar o ataque de reagentes sobre a matriz durante sua dissolução. Assim, o método de digestão por via úmida foi aplicado às outras amostras de queijo, porém in natura, para verificar a aplicabilidade do método desenvolvido. As amostras in natura utilizadas foram os queijos parmesão e mussarela. Os resultados das concentrações obtidas para os minerais determinados nessas amostras são apresentados nas tabelas 4.16 e 4.17.

Os resultados do teste estatístico (tabelas 4.16 e 4.17) mostraram que as médias obtidas entre os dois procedimentos de digestão foram consideradas iguais para todos os elementos analisados, com exceção do potássio analisado na amostra de queijo mussarela. Uma explicação para isto estaria no fato que no queijo mussarela é permitida a adição de carragenanas, como agente espessante ou estabilizante, que são altamente reativas com as proteínas do leite e interagem fortemente com sais de potássio e cálcio.

O processo de liofilização pode ajudar na digestão das amostras. Isso foi comprovado no trabalho de CONI et al. (1995), que relataram as vantagens em se utilizar amostras liofilizadas para a análise de metais por ICP OES. Os autores verificaram que a liofilização da amostra levou à diminuição no tempo de digestão, além de diminuir o grau de diluição do ácido utilizado na digestão. No nosso estudo, porém, observou-se que mesmo trabalhando com amostras in natura é possível utilizar uma digestão parcial com ácido clorídrico em condições brandas para se determinar eficientemente muitos minerais.

Tabela 4.16: Resultados e comparações das médias obtidas para os elementos determinados por ICP OES em queijo parmesão in natura após as digestões via seca e via úmida em chapa elétrica (em mg kg⁻¹)

ELE/O	Concentrações obtidas (Média ± DP)		Comparação Métodos A x B
	Método A Dig. via seca	Método B Dig. via úmida chapa	
Ca	11673 ± 376 (3) ^a	11454 ± 82 (3) ^a	+
Cr	0,29 ± 0,04 (3) ^a	0,29 ± 0,02 (3) ^a	+
Cu	0,96 ± 0,14 (3) ^a	0,79 ± 0,03 (3) ^a	+
Fe	2,84 ± 0,21 (3) ^a	2,92 ± 0,13 (3) ^a	+
K	1051 ± 194 (3) ^a	957 ± 9 (3) ^a	+
Mg	411 ± 15 (3) ^a	408 ± 13 (3) ^a	+
Mn	0,44 ± 0,03 (3) ^a	0,41 ± 0,01 (3) ^a	+
Na	10378 ± 241(3) ^a	10365 ± 57 (3) ^a	+
P	7602 ± 141 (3) ^a	7298 ± 112 (3) ^a	+
Zn	61,0 ± 0,4 (3) ^a	60,6 ± 1,2 (3) ^a	+

+: aceita (as médias podem ser consideradas iguais ao nível de significância de 95 %)

-: rejeita (as médias não são consideradas iguais ao nível de significância de 95%)

a: números de determinações individuais

DP: desvio-padrão

Tabela 4.17: Resultados e comparação das médias obtidas para os elementos determinados por ICP OES em queijo mussarela in natura após as digestões via seca e via úmida em chapa elétrica (em mg kg⁻¹)

ELE/O	Concentrações obtidas (Média ± DP)		Comparação Métodos A x B
	Método A Dig. via seca	Método B Dig. via úmida chapa	
Ca	7228 ± 82 (3) ^a	6825 ± 33 (3) ^a	+
Cr	0,26 ± 0,03 (3) ^a	0,28 ± 0,03 (3) ^a	+
Cu	0,56 ± 0,04 (3) ^a	0,54 ± 0,11 (3) ^a	+
Fe	3,97 ± 0,17 (3) ^a	4,00 ± 0,29 (3) ^a	+
K	1043 ± 138 (3) ^a	568 ± 14 (3) ^a	-
Mg	256 ± 4 (3) ^a	251 ± 22 (3) ^a	+
Mn	0,33 ± 0,02 (3) ^a	0,33 ± 0,01 (3) ^a	+
Na	4561 ± 92(3) ^a	4528 ± 49 (3) ^a	+
P	5020 ± 168 (3) ^a	4997 ± 106 (3) ^a	+
Zn	37,2 ± 0,9 (3) ^a	36,9 ± 1,0 (3) ^a	+

+: aceita (as médias podem ser consideradas iguais ao nível de significância de 95 %)

-: rejeita (as médias não são consideradas iguais ao nível de significância de 95%)

a: números de determinações individuais

DP: desvio-padrão

4.5 Estudo da variação na concentração de ácido na solução digerida por via úmida em chapa

TODOLÍ e MERMET (1999) relataram que os efeitos dos ácidos são uma das mais importantes fontes de interferência para as técnicas de espectroscopia atômica. Os efeitos dos ácidos não se referem somente ao aumento da sua concentração na solução, uma vez que a baixas concentrações de ácido clorídrico (0,001%-0,01%v/v) foi verificado um aumento no sinal em relação ao sinal produzido por água pura. Este efeito foi atribuído não à eficiência de transporte, mas à mudança na composição do aerosol.

Nas digestões por via úmida das amostras de achocolatado, iogurte, queijo petit suisse e queijo parmesão e mussarela in natura foi verificada a possibilidade da concentração de ácido na solução digerida ser diferente da concentração de ácido dos padrões da curva de calibração, podendo causar aumento ou diminuição nas leituras do ICP. Isso foi necessário uma vez que a digestão via úmida proposta resultou em digestão incompleta da amostra, sem o conhecimento prévio de quanto do ácido originalmente adicionado tinha sido consumido durante a digestão. Para avaliar a influência da concentração de ácido na solução digerida, antes e depois de evaporada a solução do digerido (item 3.5.3 do capítulo 3) para as amostras de achocolatado, iogurte, queijo petit suisse, queijo mussarela in natura e queijo parmesão in natura, os resultados das comparações entre as médias obtidas são apresentados nas tabelas 4.18 a 4.21. Pelos resultados obtidos, verificamos que não houve diferença estatisticamente significativa entre a solução originalmente digerida por via úmida em chapa elétrica e esta mesma solução que foi submetida à secura e depois avolumada no mesmo meio ácido dos padrões da curva de calibração. Isso comprovou não haver interferência decorrente do meio da solução.

Tabela 4.18: Resultados dos elementos determinados por digestão via úmida em chapa antes e após o teste da variação de concentração do ácido na solução do digerido

ELE/O	ACHOCOLATADO		IOGURTE		QUEIJO PETIT SUISE	
	Método A	Método B	Método A	Método B	Método A	Método B
	Dig.chapa (Média ± DP)	Dig.Evap (Média ± DP)	Dig.chapa (Média ± DP)	Dig.Evap (Média ± DP)	Dig.chapa (Média ± DP)	Dig.Evap (Média ± DP)
Ca	723 ± 18 (3) ^a	717 ± 11 (3) ^a	927 ± 24 (3) ^a	939 ± 6 (3) ^a	2153 ± 70 (3) ^a	2124 ± 25 (3) ^a
Cr	0,06 ± 0,02(3) ^a	0,06 ± 0,02(3) ^a	0,04 ± 0,01(3) ^a	0,03 ± 0,02(3) ^a	0,07 ± 0,01(3) ^a	0,07 ± 0,01(3) ^a
Cu	0,52 ± 0,02(3) ^a	0,54 ± 0,02(3) ^a	0,05 ± 0,01(3) ^a	0,05 ± 0,01(3) ^a	0,22 ± 0,01(3) ^a	0,21 ± 0,04(3) ^a
Fe	5,48 ± 0,05(3) ^a	5,34 ± 0,11(3) ^a	1,94 ± 0,10(3) ^a	1,97 ± 0,34(3) ^a	29,1 ± 0,1(3) ^a	29,5 ± 1,4(3) ^a
K	1756 ± 10 (3) ^a	1760 ± 21 (3) ^a	1358 ± 11 (3) ^a	1365 ± 39 (3) ^a	980 ± 6 (3) ^a	973 ± 18 (3) ^a
Mg	146 ± 1 (3) ^a	145 ± 3 (3) ^a	81,3 ± 1,1 (3) ^a	80,6 ± 0,8 (3) ^a	74,5 ± 1,3 (3) ^a	74,1 ± 1,1 (3) ^a
Mn	0,63 ± 0,02(3) ^a	0,64 ± 0,02(3) ^a	0,28 ± 0,01(3) ^a	0,27 ± 0,01(3) ^a	0,35 ± 0,02(3) ^a	0,36 ± 0,02(3) ^a
Na	655 ± 32 (3) ^a	658 ± 6 (3) ^a	346 ± 11 (3) ^a	343 ± 9 (3) ^a	283 ± 8 (3) ^a	288 ± 5 (3) ^a
P	639 ± 7 (3) ^a	644 ± 21 (3) ^a	700 ± 7 (3) ^a	687 ± 11 (3) ^a	1410 ± 16 (3) ^a	1476 ± 11 (3) ^a
Zn	3,02 ± 0,07(3) ^a	2,95 ± 0,17(3) ^a	3,27 ± 0,20(3) ^a	3,33 ± 0,30(3) ^a	3,15 ± 0,23(3) ^a	3,26 ± 0,11(3) ^a

a: números de determinações individuais DP: desvio-padrão

Tabela 4.19: Comparação das médias obtidas para as amostras de achocolatado, iogurte e queijo petit suisse determinados por ICP OES, após a digestão via úmida em chapa elétrica e para a solução digerida que depois foi levada à secura e avolumada no mesmo meio ácido da curva de calibração

ELE/O	COMPARAÇÕES		
	ACHOCOLATADO	IOGURTE	QUEIJO PETIT SUISE
	Método A x B	Método A x B	Método A x B
Ca	+	+	+
Cr	+	+	+
Cu	+	+	+
Fe	+	+	+
K	+	+	+
Mg	+	+	+
Mn	+	+	+
Na	+	+	+
P	+	+	+
Zn	+	+	+

A: Digestão via úmida em chapa; B: Solução digerida por via úmida em chapa que foi evaporada à secura e avolumada na solução a 10% de ácido clorídrico (meio ácido da curva de calibração)

+: aceita (as médias podem ser consideradas iguais ao nível de significância de 95 %)

-: rejeita (as médias não são consideradas iguais ao nível de significância de 95%)

Tabela 4.20: Resultados dos elementos determinados por digestão via úmida em chapa elétrica antes e após o teste da variação de concentração de ácido na solução digerida com ácido clorídrico

ELE/O	Q. PARMESÃO IN NATURA		Q. MUSSARELA IN NATURA	
	Método A Dig. Via úmida em chapa (Média ± DP)	Método B Dig. Via úmida em chapa evap. (Média ± DP)	Método A Dig. Via úmida em chapa (Média ± DP)	Método B Dig. Via úmida em chapa evap. (Média ± DP)
Ca	11454 ± 82 (3) ^a	11405 ± 174 (3) ^a	6825 ± 33 (3) ^a	7072 ± 153 (3) ^a
Cr	0,29 ± 0,02 (3) ^a	0,30 ± 0,02 (3) ^a	0,28 ± 0,03 (3) ^a	0,24 ± 0,03 (3) ^a
Cu	0,79 ± 0,03 (3) ^a	0,83 ± 0,02 (3) ^a	0,54 ± 0,11 (3) ^a	0,57 ± 0,16 (3) ^a
Fe	2,92 ± 0,13 (3) ^a	2,95 ± 0,28 (3) ^a	4,00 ± 0,29 (3) ^a	4,08 ± 0,62 (3) ^a
K	957 ± 9 (3) ^a	956 ± 11 (3) ^a	568 ± 14 (3) ^a	566 ± 17 (3) ^a
Mg	408 ± 13 (3) ^a	406 ± 6 (3) ^a	251 ± 22 (3) ^a	252 ± 22 (3) ^a
Mn	0,41 ± 0,01 (3) ^a	0,42 ± 0,02 (3) ^a	0,33 ± 0,01 (3) ^a	0,33 ± 0,02 (3) ^a
Na	10365 ± 57 (3) ^a	10437 ± 135 (3) ^a	4528 ± 49 (3) ^a	4593 ± 57 (3) ^a
P	7298 ± 112 (3) ^a	7366 ± 172 (3) ^a	4997 ± 106 (3) ^a	5093 ± 228 (3) ^a
Zn	60,6 ± 1,2 (3) ^a	60,8 ± 1,1 (3) ^a	36,9 ± 1,0 (3) ^a	37,0 ± 1,6 (3) ^a

a: número de determinações individuais

Tabela 4.21: Comparação das médias obtidas pelo teste de Tukey-Kramer para as amostras de queijo parmesão e mussarela in natura, determinados por ICP OES, após a digestão via úmida em chapa elétrica e para esta solução que foi levada à secura e avolumada no mesmo meio ácido da curva de calibração

Elemento	Comparações	
	Q. parmesão in natura	Q. mussarela in natura
	Método A x B	Método A x B
Ca	+	+
Cr	+	+
Cu	+	+
Fe	+	+
K	+	+
Mg	+	+
Mn	+	+
Na	+	+
P	+	+
Zn	+	+

A: Digestão via úmida em chapa elétrica; B: Solução digerida por via úmida em chapa elétrica que foi evaporada à secura e avolumada na solução a 10% de ácido clorídrico (meio ácido da curva de calibração)

+: aceita (as médias podem ser consideradas iguais ao nível de significância de 95 %)

-: rejeita (as médias não são consideradas iguais ao nível de significância de 95%)

Por meio deste trabalho verificou-se que não há necessidade de destruição total da matéria orgânica da amostra, que pode levar até alguns dias para a determinação de minerais em amostras de leite e produtos lácteos.

A digestão por via úmida em chapa elétrica foi realizada em tempo relativamente curto (2 h), sem a necessidade de investimento para a compra e manutenção de um equipamento relativamente caro, que é o forno de microondas. Embora o tempo de digestão em forno de microondas comumente usado não passe de alguns minutos, deve-se observar que leva-se mais tempo para esfriar os tubos de digestão do que com o próprio tempo gasto para a digestão da amostra. Muitos analistas aceleram o resfriamento dos tubos de microondas colocando-os em banho de gelo, porém isso diminui o seu tempo de vida útil. A presença de matéria orgânica não totalmente destruída das amostras não influenciou a sua determinação por ICP OES, obtendo-se resultados concordantes para os elementos analisados nas amostras de leite e produtos lácteos em comparação com os resultados obtidos com amostras onde a destruição da matéria orgânica foi total. Além disso, não foram observadas perdas do analito durante o tratamento da amostra por via úmida em chapa elétrica, para os elementos estudados.

Mesmo obtendo-se uma dissolução parcial da amostra não houve a necessidade de se fazer determinações no dia da preparação da amostra, indicando a versatilidade deste método.

4.6 Determinação dos limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e de quantificação foram determinados de acordo com a definição da IUPAC (CURRIE, 1995). Para a determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) pela técnica de ICP OES, foram efetuadas leituras de 10 réplicas do primeiro padrão utilizado na curva de calibração.

Para o cálculo do LD e LQ pela técnica de AANI foram utilizadas as seguintes expressões:

$$LD = \frac{3\sqrt{BG}}{LT} \quad (4.1)$$

$$LQ = 10 \frac{\sqrt{BG}}{LT} \quad (4.2)$$

onde,

BG: radiação de fundo

LT: tempo de contagem

O valor da radiação de fundo (BG), foi obtido diretamente de dados emitidos pelo programa VISPECT 2, para o fotopico do elemento de interesse.

O valor de LD expresso pela equação 4.1 representa a taxa de contagem correspondente à massa mínima detectável.

Utilizando-se o valor de LD obtido para a amostra e padrão e considerando o tempo de contagem (LT), calculou-se a concentração mínima detectável.

Relacionando-se os valores de LQ para a amostra e padrão e considerando o tempo de contagem, calculou-se o limite de quantificação para cada elemento.

Na tabela 4.22 são apresentados os limites de detecção e quantificação para ICP OES.

Tabela 4.22: Limites de detecção e quantificação para os elementos determinados por ICP OES nas linhas escolhidas

ELEMENTO	λ (nm)	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)
Ca	422,673	0,108	0,36
Cr	267,716	0,0021	0,007
Cu	327,396	0,006	0,02
Fe	259,940	0,007	0,022
K	766,491	0,21	0,70
Mg	280,270	0,025	0,083
Mn	257,610	0,0004	0,0014
Na	589,592	0,18	0,61
P	213,618	0,13	0,42
Zn	213,856	0,0054	0,018

Na tabela 4.23 são apresentados os limites de detecção e quantificação obtidos para as amostras de leite em pó integral e queijo mussarela pela técnica de AANI.

Tabela 4.23: Limites de detecção e quantificação determinados em amostras de leite em pó integral e queijo mussarela pela técnica de AANI.

Elemento	Energia dos raios gama, kev	LEITE PÓ INTEGRAL		QUEIJO MUSSARELA	
		LD (mg kg ⁻¹)	LQ (mg kg ⁻¹)	LD (mg kg ⁻¹)	LQ (mg kg ⁻¹)
Ca	3083	181	603	184	613
Fe	1099	0,45	1,94	0,90	3,0
K	1524	97	324	259	862
Mg	843	53	178	66	220
Mn	846	0,06	0,20	0,13	0,42
Na	1368	3,7	12	10	34
Zn	1115	0,23	0,75	0,06	0,18

Na determinação dos LD e LQ para cálcio, potássio, magnésio, manganês e sódio pela técnica de AANI foram utilizadas as seguintes condições: irradiação de 2 minutos, tempo de resfriamento de 3 minutos e tempo de contagem de 300 segundos. Para a determinação dos limites de detecção e quantificação para ferro e zinco utilizou-se as seguintes condições: tempo de irradiação de 8 horas, tempo de resfriamento de cerca de 15 dias e tempo de contagem de cerca de 50000 segundos.

Podemos verificar que os limites obtidos pela técnica de AANI são maiores que aqueles obtidos pela técnica de ICP OES. No caso da AANI os valores de LD e LQ foram maiores, pois para o cálculo desses limites foram consideradas as condições de análise e a matriz de interesse. Já no caso do ICP OES, os cálculos foram feitos considerando apenas as leituras do padrão, sem levar em conta a influência da matriz.

CAPITULO 5

CONCLUSÕES

A digestão parcial com uso de ácido clorídrico diluído permitiu a determinação de minerais e elementos traço (Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn) em amostras de leite e produtos lácteos, sendo os resultados comparáveis aos obtidos com uma digestão completa da matéria orgânica e com a técnica de AANI, que não requer tratamento de amostra, com boa exatidão e repetibilidade.

O método de dissolução parcial adotado para análise de minerais foi realizado em tempo relativamente curto (2 horas) e mostrou-se bastante versátil, uma vez que não há necessidade de se utilizar um reagente específico, não comumente utilizado no laboratório; e a medida no ICP OES não precisa ser realizada no dia da preparação da amostra. Além disso não foi encontrada interferência de matriz.

Uma outra vantagem do método de dissolução adotado para análise de minerais e elementos traço em leite e derivados é que este procedimento é realizado em chapa elétrica, não necessitando de dispor de um equipamento caro, como o forno de microondas. Além disso, com o método de dissolução parcial em chapa elétrica pode-se preparar várias amostras ao mesmo tempo.

Em virtude da não necessidade de destruição total da matéria orgânica da amostra, diminui-se o tempo gasto no preparo de amostra e, portanto o risco de contaminação também.

A aplicabilidade do método de dissolução parcial não se restringe somente à amostras liofilizadas, mas também para amostras in natura.

Verificou-se que os limites de detecção e quantificação determinados por AANI foram maiores do que os obtidos para a técnica de ICP OES, pois para o seu cálculo foram utilizados dados obtidos com a própria amostra, enquanto que para o ICP OES os limites foram calculados considerando-se as leituras de um padrão, embora não tenha encontrado interferência de matriz.

As técnicas de AANI e ICP OES foram adequadas à análise de minerais e elementos traço em amostras de leite e diversos produtos lácteos.

ANEXO A

- Análise estatística utilizada na avaliação dos resultados

Os resultados obtidos para os elementos determinados (Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn) nas amostras de leite e produtos lácteos (achocolatado, iogurte, queijos petit suisse, parmesão in natura e mussarela in natura) utilizando as técnicas de AANI e ICP-AES foram submetidos ao teste de análise de variância, ANOVA – one way analysis e subseqüentemente ao teste de Tukey-Kramer. Enquanto que os resultados obtidos para cromo, cobre e fósforo das amostras dos queijos mussarela, minas, prato e parmesão foram submetidos ao teste t (para dados não emparelhados). Isto foi devido a uma limitação do programa estatístico utilizado, que aplica o teste t para comparar o conjunto constituído por dois grupos, enquanto que para um conjunto constituído por três ou mais grupos, o programa faz a comparação entre os grupos pelo teste de Tukey-Kramer.

Para aplicação dos testes estatísticos foi utilizado o programa GraphPad InStat – versão 2.01, 1990-1993.

A análise de variância, ANOVA, é utilizada como procedimento para testar a igualdade de médias, mas não dá indicação de quais médias são significativamente diferentes (TRIOLA, 1998).

Para determinar quais médias são significativamente diferentes aplica-se o teste de comparação múltipla, que faz comparação simultânea de três ou mais médias, preferencialmente ao teste-t.

O teste de comparação múltipla usado foi o teste de Tukey-Kramer (VIEIRA, 1981).

Para aplicação do teste de Tukey-Kramer compara-se o valor de q tabelado (chamado de q crítico) que leva em conta o nível de significância e o número de graus de liberdade com o valor de q calculado segundo a fórmula abaixo apresentada:

$$q_{\text{calculado}} = \frac{X_1 - X_2}{\sqrt{\frac{MSE}{N}}} \quad (1)$$

(para tamanhos iguais de amostra)

onde,

MSE: média quadrática do erro no resíduo

X: média dentro de um tratamento

N: número de réplicas

$$q_{\text{calculado}} = \frac{X_1 - X_2}{\sqrt{\frac{MSE}{2} \left(\frac{1}{N_a} + \frac{1}{N_b} \right)}} \quad (2)$$

(para tamanhos diferentes de amostra)

Quando o valor de q_{calc} é maior que o valor de q_{tabelado} considera-se a diferença estatisticamente significativa entre as médias comparadas.

Para exemplificar a aplicação do teste de Tukey-Kramer utilizaremos os dados da comparação das médias de cálcio entre os métodos de digestão por via seca e digestão via úmida em chapa elétrica para as amostras de leite em pó integral.

Na tabela abaixo são apresentadas as médias de cálcio obtidas para os diferentes métodos testados. Esta tabela corresponde a uma parte da tabela. 4.1 do capítulo 4.

Método	Número de réplicas	Concentração média de cálcio
Digestão por via seca	6	9035,5
Digestão via úmida em chapa elétrica	5	8881,2

Primeiramente os dados foram submetidos à análise de variância, que forneceu o valor de 36652, correspondente à média quadrática no resíduo (MSE).

Como os tamanhos de amostra são diferentes para os métodos testados, utilizaremos a fórmula expressa pela equação 2 deste apêndice:

$$q_{\text{calculado}} = \frac{X_1 - X_2}{\sqrt{\frac{MSE}{2} \left(\frac{1}{N_a} + \frac{1}{N_b} \right)}}$$

Sendo X_1 e X_2 as concentrações médias de cálcio obtidas para os métodos testados, temos:

$$q_{\text{calculado}} = 9035,5 - 8881,2 / [36652/2 (1/6 + 1/5)]^{1/2}$$

$$q_{\text{calculado}} = 1,882 \text{ (como mostrado no apêndice)}$$

O valor de q crítico definido em relação ao número de graus de liberdade e ao nível de significância considerado, neste caso é de 4,367.

Como o valor de $q_{\text{calculado}}$ (1,882) é menor do que o valor de q crítico (4,367) considera-se que as médias obtidas para cálcio utilizando-se os métodos de digestão por via seca e via úmida em chapa elétrica são estatisticamente iguais ao nível de significância de 95% considerados.

Para verificar se as médias obtidas entre os diferentes tratamentos de digestão dados às amostras de material de referência certificado apresentavam diferença estatisticamente significativa foi utilizado o teste de Dunnett (PITOCHELLI, 2002).

O teste de Dunnett é similar ao teste de Tukey, porém é usado somente se as comparações são feitas com relação a um grupo particular, isto é, um grupo controle.

Neste método um valor de t^* é utilizado para cada comparação. Este valor de t^* tabelado, entretanto não é o t -Student e sim outro t especial para determinar significância estatística.

O valor de Dunnett para a amostra é calculado segundo as fórmulas:

$$q_{\text{calculado}} = \frac{X_{\text{controle}} - X_a}{\sqrt{\frac{2MSE}{N}}} \quad (3)$$

(para tamanhos iguais de amostra)

$$q_{\text{calculado}} = \frac{X_{\text{controle}} - X_a}{\sqrt{MSE \left(\frac{1}{Na} + \frac{1}{Nb} \right)}} \quad (4)$$

(para tamanhos diferentes de amostra)

onde,

MSE: média quadrática do erro

N: tamanho da amostra

X_{controle} : média da amostra controle

X_a : média da amostra

O valor crítico tabelado de Dunnett é obtido em relação ao nível de significância e o número de graus de liberdade considerados:

$$q_{\text{crítico}} = t^*_{1-\alpha, t-1, t(r-1)}$$

onde,

t: número de tratamentos

r: repetições

$1-\alpha$: nível de significância considerado

Quando a diferença obtida entre as médias dos dois tratamentos testados (controle e amostra) exceder o valor crítico verifica-se uma diferença significativa entre as médias ao nível de significância considerado.

Para ilustrar a aplicação do teste de Dunnett, consideremos o exemplo de cálculo do valor de q para a comparação entre o valor certificado e a concentração de cálcio obtida após a digestão do material de referência por digestão por via seca.

Como exemplo consideremos o grupo constituído pelo método de digestão por via seca com seis pontos e média de 9330,5 e pelo valor certificado com três pontos e média de 9220 (valor controle).

Grupo	Número de réplicas	Concentração média de cálcio
Dig. via seca	6	9330,5
Valor certificado	3	9220

Anteriormente à aplicação do teste de Dunnett é feita uma análise de variância para o grupo estudado. Pela análise de variância obtém-se valores da média quadrática do resíduo (MSE), que é utilizado na fórmula para o cálculo do valor de q, dado pela equação 4 deste apêndice:

$$q_{\text{calculado}} = \frac{X_{\text{controle}} - X_a}{\sqrt{MSE \left(\frac{1}{Na} + \frac{1}{Nb} \right)}}$$

Neste caso, X_{controle} é o valor certificado de cálcio, que é 9220; X_a é a concentração média de cálcio obtida para o método de digestão por via seca e equivale a 9330,5 para este exemplo; MSE é o valor da média quadrática do resíduo (obtido pela análise de variância, neste caso 86716); N_a é o número de pontos para a digestão por via seca, que é 6 e N_b é o número de pontos para o valor certificado que é 3.

Assim temos:

$$q_{\text{calculado}} = 9220 - 9330,5 / [86716 (1/6 + 1/3)]^{1/2}$$

$$q_{\text{calculado}} = 0,5307$$

O valor de q tabelado para este exemplo é 2,715. Como o valor de q calculado é menor que o valor de q tabelado, a conclusão é que a concentração média de cálcio obtida após a digestão por via seca não difere estatisticamente com a concentração de cálcio do material de referência certificado ao nível de significância de 95%.

APÊNDICE A

Tabela B.1- Valores de q calculados para as comparações entre os diferentes métodos de digestão em leite em pó integral e o valor de q crítico para o teste de Tukey-Kramer.

Leite em pó integral instantâneo								
Ele/o	q calc. A x B	q calc. A x C	q calc. A x D	q calc. A x E	q calc. E x B	q calc. E x C	q calc. E x D	q crítico
Ca	1,882	2,189	1,597	3,369	1,701	1,022	1,535	4,367
Cr	0,8676	0,4250	4,959	*	*	*	*	4,111
Cu	0,5006	4,394	0,6195	*	*	*	*	4,151
Fe	1,931	0,2627	0,02021	2,405	3,981	1,855	2,065	4,333
K	0,6469	2,123	0,9690	0,7068	1,235	2,451	0,2271	4,333
Mg	0,5144	1,530	0,4200	1,740	1,320	0,1819	1,143	4,333
Mn	0,2060	0,6728	2,355	3,364	3,196	2,331	0,8740	4,333
Na	0,1016	1,914	1,728	1,531	1,459	0,1131	2,708	4,367
P	1,621	0,1440	0,2879	na	na	na	na	4,111
Zn	0,04330	0,7602	0,1237	1,960	1,990	1,164	1,849	4,367

A: Digestão via seca; B: Digestão via úmida em chapa elétrica; C: Digestão via úmida com microondas utilizando o programa LI1; D: Digestão via úmida com microondas utilizando o programa LI2; E: Técnica de AANI

na: não analisado *: não detectado

Tabela B.2 - Valores de q calculados para as comparações entre os diferentes métodos de digestão em leite em pó desnatado e o valor de q crítico para o teste de Tukey-Kramer.

Leite em pó desnatado instantâneo								
Ele/o	q calc. A x B	q calc. A x C	q calc. A x D	q calc. A x E	q calc. E x B	q calc. E x C	q calc. E x D	q crítico
Ca	0,6911	0,1173	4,118	0,5359	0,02840	0,3625	4,030	4,333
Cr	0,2908	0,1187	3,443	*	*	*	*	4,111
Cu	0,6498	0,4244	1,698	*	*	*	*	4,111
Fe	0,6246	0,03343	2,708	2,012	2,415	1,825	3,897	4,407
K	0,5316	0,3014	1,258	1,354	1,788	0,9117	0,08288	4,333
Mg	2,056	1,598	4,124	0,9275	0,5260	0,4086	2,365	4,367
Mn	0,1621	2,647	2,912	1,588	1,456	0,9169	1,146	4,333
Na	1,025	0,7404	0,2557	0,9288	0,2042	0,2572	1,029	4,367
P	0,5259	3,134	2,397	na	na	na	na	4,199
Zn	0,3420	0,3046	1,371	4,265	4,023	3,579	4,877	4,367

A: Digestão via seca; B: Digestão via úmida em chapa elétrica; C: Digestão via úmida com microondas utilizando o programa LI1; D: Digestão via úmida com microondas utilizando o programa LI2; E: Técnica de AANI

*: não detectado

na: não analisado

Tabela B.3 - Valores de q calculados para as comparações de médias obtidas pelos diferentes métodos de digestão em amostras de queijo mussarela e minas e o valor de q crítico para o teste de Tukey-Kramer.

Ele/o	Queijo Mussarela				Queijo Minas			
	q calc. A x B	q calc. A x C	q calc. B x C	q crítico	q calc. A x B	q calc. A x C	q calc. B x C	q crítico
Ca	2.606	0,2094	2,815	4,339	0,5847	15,518	16,103	4,339
Fe	0,9463	0,6377	0,3759	4,602	2,068	1,555	0,5131	4,339
K	0,3037	1,093	1,397	4,339	3,548	0,09525	4,073	4,602
Mg	0,7341	13,242	12,585	4,602	3,623	0,6859	4,309	4,339
Mn	0,7615	3,155	2,239	4,165	4,864	1,725	3,136	3,949
Na	2,082	1,775	0,3072	4,339	0,05721	0,8963	0,9535	4,339
Zn	0,2981	2,236	1,938	4,339	2,245	1,791	4,036	4,339

A: Digestão via seca; B: Digestão via úmida em chapa elétrica; C: Técnica de AANI

Tabela B.4 - Valores de q calculados para as comparações de médias obtidas entre os métodos de digestão para amostras de queijo prato e parmesão e o valor de q crítico para o teste de Tukey-Kramer.

Ele/o	Queijo Prato				Queijo Parmesão			
	q calc. A x B	q calc. A x C	q calc. B x C	q crítico	q calc. A x B	q calc. A x C	q calc. B x C	q crítico
Ca	0,6871	2,858	3,545	4,339	0,2408	0,4534	0,6942	4,339
Fe	0,3253	3,655	3,723	4,165	0,4185	0,4329	0,7964	4,165
K	1,268	1,231	2,365	4,602	3,371	1,269	2,102	4,339
Mg	2,694	3,698	1,289	4,602	0,9236	3,325	4,249	4,339
Mn	0,2379	3,569	3,331	4,339	0,7913	0,2949	1,003	4,602
Na	0,8972	1,437	2,335	4,339	0,5837	0,1208	0,4629	4,339
Zn	1,236	0,4121	0,7372	4,041	1,706	0,8420	0,9264	4,041

A: Digestão via seca; B: Digestão via úmida em chapa elétrica; C: Técnica de AANI

Tabela B.5 - Valores de q calculados para as comparações entre os diferentes métodos de digestão em amostras de achocolatado e iogurte e o valor de q crítico para o teste de Tukey-Kramer.

Ele/o	Achocolatado				Iogurte			
	q calc. A x B	q calc. A x C	q calc. B x C	q crítico	q calc. A x B	q calc. A x C	q calc. B x C	q crítico
Ca	1,049	2,011	0,9620	4,529	0,6761	1,149	0,4733	4,529
Fe	0,3745	0,9987	1,373	4,529	0,1627	0,2169	0,05422	4,529
K	0,03266	0,06531	0,09797	4,529	2,475	1,915	0,5595	4,339
Mg	2,933	1,967	4,591	4,681	0,3366	1,010	1,347	4,529
Mn	0,09305	0,09305	8,5E-12	4,529	1,528	1,366	5,2E-12	4,681
Na	0,5073	0,08952	0,4178	4,529	3,081	4,437	1,681	4,681
Zn	0,2432	0,8919	1,135	4,529	0,1449	0,05433	0,09055	4,529

A: Digestão via seca; B: Digestão via úmida em chapa elétrica; C: Técnica de AANI

Tabela B.6 - Valores de q calculados para as comparações entre os diferentes métodos de digestão em amostras de queijo parmesão e mussarela in natura e o valor de q crítico para o teste de Tukey-Kramer.

Ele/o	Queijo Parmesão in natura			Queijo Mussarela in natura		
	q calc. A x B	q calc. B x C	q crítico	q calc. A x B	q calc. B x C	q crítico
Ca	1,555	0,3479	4,339	4,888	3,289	5,040
Cr	0,1974	0,5922	4,339	0,7428	2,228	4,339
Cu	3,916	0,8757	4,602	0,2323	0,4723	4,602
Fe	0,5815	0,2653	4,602	0,09922	0,3402	4,339
K	1,678	0,006628	4,602	10,228	0,05742	4,339
Mg	0,5406	0,2949	4,339	0,4784	0,09569	4,339
Mn	2,705	0,5410	4,339	1,68E-13	0,3693	4,339
Na	0,1382	0,7690	4,339	0,8326	1,657	4,339
P	3,668	0,8286	4,339	0,2313	0,9548	4,339
Zn	0,8120	0,3748	4,339	0,5250	0,2386	4,339

A: Digestão via seca; B: Digestão via úmida em chapa elétrica; C: Digerido B evaporado

Tabela B.7 - Valores de q calculados para as comparações entre os diferentes métodos de digestão em amostra de queijo petit suisse e o valor de q crítico para o teste de Tukey-Kramer.

Ele/o	Queijo Petit Suisse				q crítico
	q calculado A x B	q calculado A x C	q calculado B x C	q calculado B x D	
Ca	0,6341	1,721	1,087	1,126	4,529
Cr	0,1565	*	*	0,1044	4,339
Cu	1,719	*	*	0,2148	4,339
Fe	1,903	3,807	5,710	0,7982	4,529
K	2,782	1,317	1,465	0,4247	4,529
Mg	1,510	1,309	0,04153	0,2524	4,681
Mn	0,6070	0,2714	0,8143	0,6070	4,681
Na	3,509	3,110	0,02906	0,9748	4,681
P	9,043	na	na	3,586	4,602
Zn	0,1183	2,682	2,800	1,380	4,529

A: Digestão via seca; B: Digestão via úmida em chapa elétrica; C: Técnica de AANI; D: Digerido B evaporado

na: não analisado

*: não detectado

Tabela B.8 - Valores de q calculados e o valor de q crítico utilizando o teste de Tukey-Kramer para as comparações das concentrações obtidas das amostras de achocolatado e iogurte digeridas por via úmida e a concentração obtida da solução digerida que foi evaporada e lida novamente.

Ele/o	Achocolatado		Iogurte	
	q calculado A x B	q crítico	q calculado A x B	q crítico
Ca	0,8745	4,529	1,183	4,529
Cr	0	4,339	0,4629	4,339
Cu	1,604	4,339	0	4,339
Fe	1,311	4,529	0,1988	4,529
K	0,08981	4,529	0,4950	4,529
Mg	0,8380	4,681	0,4208	4,529
Mn	0,2791	4,529	0,7638	4,681
Na	0,2387	4,529	0,6778	4,681
P	0,6322	4,339	0,8080	4,339
Zn	0,8513	4,529	0,3441	4,529

A: Digestão por via úmida em chapa elétrica; B: Solução digerida por via úmida em chapa que foi evaporada e lida novamente.

Tabela B.9 - Valores de q calculados para as comparações entre os diferentes métodos de digestão em material de referência certificado NIST 8435 Whole Milk Powder e o valor de q crítico para o teste de Dunnett.

NIST 8435 – Whole Milk Powder						
Ele/o	q calculado A x B	q calculado A x C	q calculado A x D	q calculado A x E	q calculado A x F	q crítico
Ca	0,5307	0,05123	0,7270	3,950	0,5915	2,715
Cu	0,6286	1,519	0,7809	0,4685	*	2,750
Fe	0,2013	0,4575	1,682	*	0,2467	2,690
K	0,7437	0,5072	0,1175	4,697	0,7645	2,723
Mg	0,06838	0,9345	4,303	4,566	0,7218	2,723
Mn	0,1608	0,4019	0,9340	0,9340	1,116	2,780
Na	0,8794	0,03985	2,216	1,682	0,009	2,715
P	0,4392	0,9991	3,164	5,737	na	2,710
Zn	0,2019	0,8524	3,594	0,9324	0,6617	2,723

A: Valor certificado (valor controle); B: Digestão por via seca; C: Digestão via úmida em chapa elétrica; D: Digestão por microondas, utilizando o programa LI1; E: Digestão por microondas, utilizando o programa LI2; F: Técnica de AANI

na: não analisado

*: não detectado

Tabela B.10 - Valores de q calculados para as comparações entre os diferentes métodos de digestão em material de referência certificado NIST 1549 Non Fat Milk Powder e o valor de q crítico para o teste de Dunnett.

NIST 1549 – Non Fat Milk Powder						
Ele/o	q calculado A x B	q calculado A x C	q calculado A x D	q calculado A x E	q calculado A x F	q crítico
Ca	0,5083	0,5083	2,398	3,795	1,126	2,760
Cu	0,8079	1,354	4,690	3,487	*	2,750
Fe	0,2328	0,1505	1,452	2,904	0,06198	2,800
K	0,05155	0,2615	2,926	2,285	2,351	2,760
Mg	2,470	4,753	8,373	6,459	0,2266	2,730
Mn	2,435	2,012	5,517	4,646	2,095	2,760
Na	1,255	0,1596	4,253	1,586	0,04157	2,750
P	0,01327	2,372	1,105	3,161	na	2,750
Zn	2,108	2,127	0,3576	0,1308	0,7851	2,750

A: Valor certificado (valor controle); B: Digestão por via seca; C: Digestão via úmida em chapa elétrica; D: Digestão por microondas, utilizando o programa LI1; E: Digestão por microondas, utilizando o programa LI2; F: Técnica de AANI

na: não analisado

*: não detectado

Tabela B.11 – Valores de t calculados t crítico para o teste t aplicado à comparação das médias de cromo e cobre para amostras de queijo (mussarela, minas, prato e parmesão liofilizados) obtidos pelos métodos de digestão via seca e via úmida em chapa elétrica

Ele/o	QUEIJO MUSSARELA		QUEIJO MINAS		QUEIJO PRATO		Q. PARMESÃO	
	t _{calculado} A x B	t _{crítico} A x B	t _{calculado} A x B	t _{crítico} A x B	t _{calculado} A x B	t _{crítico} A x B	t _{calculado} A x B	t _{crítico} A x B
Cr	2,8846	2,571	0,7206	3,182	0,9733	2,571	4,6E-13	4,303
Cu	6,928	2,447	1,4225	3,182	2,547	2,447	0,7620	2,447
P	3,814	2,776	1,906	2,306	1,450	2,447	0,7419	2,447

A: Digestão via seca; B: Digestão via úmida em chapa elétrica

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALKANANI, T.; FRIEL, J. K.; JACKSON, S. E.; LONGERICH, H. P. Comparison between digestion procedures for the multielemental analysis of milk by inductively coupled plasma mass spectrometry. **J. Agric. Food Chem.** v.42, p. 1965-1970, 1994.

AMARASIRIWARDENA, D.; KOTREBAI, M.; KRUSHEVSKA, A.; BARNES, R. M. Multielement analysis of human milk by inductively coupled plasma mass and atomic emission spectrometry after high pressure, high temperature digestion. **Can. J. Anal. Sci. Spectrosc.**, v. 42, n. 3, p. 69-78, 1997.

AMARO-LÓPEZ, M.A.; MORENO-ROJAS, R.; SÁNCHEZ-SEGARRA, P.J.; ZURERA-COSANO, G. Tratamiento de las matrices lácteas para la determinación de trazas metálicas por absorción atómica. **Alimentaria**, p. 71-78, 1996.

ANDERSON, D. L.; CUNNINGHAM, W.C.; CAPAR, S.G.; BARATTA, E. J.; MACKILL, P. Nuclear methods for food analysis at the U. S. food and drug administration. **J. Radioanal. Nucl. Chem.**, v. 249, n. 1, p. 29-32, 2001.

ARRUDA, M. A. Z.; SANTELLI, R. E. Mecanização no preparo de amostras por microondas: O estado da arte. **Quím. Nova**, v. 20, n. 6, p. 638-643, 1997.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of official analytical chemists**. 15. ed. Washington, D. C., 1995, chap. 50, p. 13.

BATISTA, I. A. R.; MARRERO, I. M. Aplicación de las microondas en la industria alimentaria. **Alimentaria**, p. 119-125, 1995.

BECKER, D. A.; GREENBERG, R. R.; STONE, S. F. The use of high accuracy NAA for the certification of NIST botanical standard reference materials. **J. Radioanal. Nucl. Chem.**, v. 60, n. 1, p. 41-53, 1992.

BERMEJO-BARRERA, P.; DOMÍNGUEZ-GONZÁLEZ, R.; SOTO-FERREIRO, R.; BERMEJO-BARRERA, A. Use of the surfactant agents in the direct determination of zinc in milk samples by flame atomic absorption spectrometry. **Analisis**, v. 23, p. 135-136, 1995.

BERMEJO-BARRERA, P.; MOREDA-PINEIRO, A.; MUNIZ-NAVEIRO, O.; GÓMEZ-FERNÁNDEZ, A. M. J.; BERMEJO-BARRERA, A. Optimization of a microwave-pseudo-digestion procedure by experimental designs for the determination of trace elements in seafood products by atomic absorption spectrometry. **Spectrochim. Acta, Part B**, v. 55, p. 1351-1371, 2000.

BIEGO, G. H.; JOYEUS, M.; HARTEMAN, P.; DEBRY, G. Determination of mineral contents in different kinds of milk and estimation of dietary intake in infants. **Food Addit. Contam.**, v. 15, n. 7, p. 775-781, 1998.

BIURRUN, M. C. Y.; LOUZAO, M. L. M.; BERMEJO-BARRERA, A.; BERMEJO-BARRERA, M. P. Estudio comparativo de la determinación de calcio em diversos tipos de leche por espectrofotometría de absorción atómica después de distintos tratamientos de la muestra. **Alimentaria**, v. 23, p. 23-25, 1991.

BOCK, R. **A Handbook of decomposition methods in analytical chemistry**. 1. ed. International textbook company, 1979. cap. 1, introduction, p. 1-32.

BODE, P. Instrumental and organizational aspects of a neutron activation analysis laboratory – Delft University of Technology, J. B. Delft, Holanda 1996.

BODE, P. Operational management of results in INAA utilizing a versatile system of control charts. **J. Radioanal. Nucl. Chem.**, v. 215, n. 1, p. 87-94, 1997.

BORKOWSKA-BURNECKA, J.; MIAZGA, W.; ZYRNICKI, W. Evaluation of digestion procedures for the analysis of vegetables by the ICP emission spectrometry. **Chem. Anal. (Warsaw)**, v. 45, p. 429-438, 2000.

BORKOWSKA-BURNECKA, J.; MIAZGA, W.; ZYRNICKI, W. Evaluation of digestion procedures for the analysis of vegetables by the ICP emission spectrometry. **Chem. Anal. (Warsaw)**, v. 45, p. 429-438, 2000.

BORKOWSKA-BURNECKA, J.; SZMIGIEL, E.; ZYRNICKI, W. Determination of major and trace elements in powdered milk by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **Chem. Anal. (Warsaw)**, v. 41, p. 625-632, 1996.

BOSS, C. B.; FREDEEN, K. J. Concepts, instrumentation, and techniques in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. Perkin Elmer. 2. ed., 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Regulamento técnico de identidade e qualidade do queijo petit Suisse. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/sda/dipoa/instnorm53.petitsuisse.htm>>. Acesso em: 11 jun. 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. Regulamento técnico de identidade e qualidade de queijos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 11 mar. 1996. O Ministro do Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento aprovam os regulamentos técnicos de identidades e qualidades de produtos lácteos.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 352, de 04 de setembro de 1997. Regulamento técnico de identidade e qualidade de queijo minas frescal. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 08 set. 1997. Seção 1, n. 172.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 364, de 04 de setembro de 1997. Regulamento técnico de identidade e qualidade de queijo mussarela. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 08 set. 1997. Seção 1, n. 172.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 353, de 04 de setembro de 1997. Regulamento técnico de identidade e qualidade de queijo parmesão. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 08 set. 1997. Seção 1, n. 172.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 358, de 04 de setembro de 1997. Regulamento técnico de identidade e qualidade de queijo prato. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 08 set. 1997. Seção 1, n. 172.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria da Vigilância. Portaria nº 31, de 13 de janeiro de 1998. Aprova o regulamento técnico referente a alimentos adicionados de nutrientes essenciais. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 30 mar. 1998, Seç. 1.

BRATTER, V. E. N DE; RECKNAGEL, S; GAWLIK, D. Speciation of Se, Fe and Zn in human-milk whey: The use of instrumental neutron activation analysis to corroborate element profiles measured with inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **Fresenius J. Anal. Chem.**, v. 353, p. 137-142, 1995. (b)

BRATTER, V. E. N.; BRATTER, P.; REINICKE, A.; SCHULZE, G.; ALVAREZ, W. O. L.; ALVAREZ, N. Determination of mineral and trace elements in total diet by inductively

coupled plasma atomic emission spectrometry: comparison of microwave-based digestion and pressurized ashing systems using different acid mixtures. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 10, p. 487-491, 1995. (a)

BURGUERA, M.; BURGUERA, J. L. Microwave-assisted sample decomposition in flow analysis. **Anal. Chim. Acta**, v. 366, p. 63-80, 1998.

CARRIÓN, N.; ITRIAGO, A.; MURILLO, M.; ELJURI, E.; FERNÁNDEZ, A. Determination of calcium, potassium, magnesium, iron, copper and zinc in maternal milk by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 9, p. 205-207, 1994.

CONI, E.; BOCCA, A.; IANNI, D.; CAROLI, S. Preliminary evaluation of the factors influencing the trace element content of milk and dairy products. **Food Chem.**, v. 52, p. 123-130, 1995.

CONI, E.; CAROLI, S.; IANNI, D.; BOCCA, A. A methodological approach to the assessment of trace elements in milk and dairy products. **Food Chem.**, v. 50, p. 203-210, 1994.

CURRIE, L. A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities – International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC Recommendations 1995). **Pure Appl. Chem.**, v. 67, n. 10, p. 1669-1723, 1995.

DANG, H. S.; JAISWAL, D.D.; NAIR, S. Daily intake of trace elements of radiological and nutritional importance by the adult Indian population. **J. Radioanal. Nucl. Chem.**, v. 249, n. 1, p. 95-101, 2001.

DE BENZO, Z. A.; VELOSA, M.; CECARELLI, C.; DE LA GUARDIA, M.; SALVADOR, A. Application of the slurry technique to biological materials: a survey of literature. **Fresenius' J. Anal. Chem.**, v. 339, p. 235-239, 1991.

DE LA FUENTE, M. A.; GUERRERO, G.; JUÁREZ, M. Manganese and zinc analysis in milk by microwave oven digestion and platform graphite furnace atomic absorption spectrometry. **J. Agric. Food Chem.**, v. 43, p. 2406-2410, 1995. (a)

DE LA FUENTE, M. A.; JUÁREZ, M. Rapid determination of calcium, magnesium, sodium and potassium in milk by flame atomic spectrometry after microwave oven digestion. **Analyst**, v. 120, p. 107-111, 1995. (b)

DE LA FUENTE, M.; CARAZO, B.; JUÁREZ, M. Determination of major minerals in dairy products digested in closed vessels using microwave heating. **J. Dairy Sci.**, v. 80, p. 806-811, 1997.

DE LA FUENTE, M.; JUÁREZ, M. Determination of phosphorus in dairy products by sample wet digestion in a microwave oven. **Anal. Chim. Acta**, v. 309, p. 355-359, 1995. (c)

DE LA GUARDIA, M.; SALVADOR, A.; BAYARRI, P.; FARRE, R. Rapid atomic spectrometry determination of sodium, potassium, calcium and magnesium in powdered milk by direct dispersion. **Analyst**, v. 111, p. 1375-1377, 1986.

DUNEMANN, L.; MEINERLING, M. Comparison of different microwave-based digestion techniques in view of their application to fat-rich foods. **Fresenius' J. Anal. Chem.**, v. 342, p. 714-718, 1992.

EBDON, L.; FOULKES, M.; SUTTON, K. Slurry nebulization in plasmas. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 12, p. 213-219, 1997.

EMMETT, S. E. Analysis of liquid milk by inductively coupled plasma mass spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 3, p. 1145-1146, 1988.

FAGIOLI, F.; LANDI, S.; LOCATELLI, C.; RIGHINI, F.; SETTIMO, R. Determination of elements in biological materials by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry with sampling of a carbonaceous slurry. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 5, p. 519-522, 1990.

FEINBERG, M. H. Definition of reference procedures for focused microwave digestion. **Analisis**, v. 19, p. 47-55, 1991.

FORD, J.E.; SCHOEDERZ, A.; SCOTT, K.J Keeping quality of milk in relation to the copper content and temperature of pasteurization. **J. Dairy Res.**, v. 53, p. 391-406, 1986.

FUKUSHIMA, M.; TAMATE, H.; NAKANO, Y. Trace elements in several species of crustaceans of Amami island group in Japan determined by activation analysis. **J. Radioanal. Nucl. Chem.**, v. 249, n. 2, p. 481-486, 2001.

GAINES, T. P.; WEST, J. W.; McALLISTER, J. F. Determination of calcium and phosphorus in milk. **J. Sci. Food Agric.**, v. 51, p. 207-213, 1990.

GARCÍA, I. L.; VINAS, P.; CAMPILLO, N.; CÓRDOBA, M. H. Extending the dynamic range of flame atomic absorption spectrometry: a comparison of procedures for the determination of several elements in milk and mineral waters using on-line dilution. **Fresenius' J. Anal. Chem.**, v. 355, p. 57-64, 1996.

GAWALKO, E. J.; NOWICKI, T. W.; BABB, J.; TKACHUK, R. Comparison of closed-vessel and focused open-vessel microwave dissolution for determination of cadmium, copper,

lead, and selenium in wheat, wheat products, corn bran, and rice flour by transverse-heated graphite furnace atomic absorption spectrometry. **J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.**, v. 80, n. 2, p. 379-387, 1997.

GHARIB, A. G.; AMINPOUR, A.A.; AHMADINIAR, A. Simulation of Iranian total mixed diets and their analysis for essential and toxic trace elements using nuclear and complementary analytical techniques. **J. Radioanal. Nucl. Chem.**, v. 249, n. 1, p. 47-60, 2001.

GLASCOCK, M. D. An overview of neutron activation analysis. [S. l.]. Disponível em: <http://www.missouri.edu/~glascock/naa.over.htm>. Acesso em: 17 mai. 2002.

GOUVEIA, S. T.; SILVA, F. V.; COSTA, L. M.; NOGUEIRA, A. R. A.; NÓBREGA, J. A. Determination of residual carbon by inductively coupled plasma optical emission spectrometry with axial and radial view configurations. **Anal. Chim. Acta**, v. 445, p. 269-275, 2001.

HOENING, M. Critical discussion of trace element analysis of plant matrices. **The Science of the Total Environment**, v. 176, p. 85-91, 1995.

HOENING, M. Preparation steps in environmental trace elements analysis-facts and traps. **Talanta**, v. 54, p. 1021-1038, 2001.

HOENING, M.; BAETEN, H.; VANHENTENRIJK, S.; VASSILEVA, E.; QUEVAUVILLER, Ph. Critical discussion on the need for an efficient mineralization procedure for the analysis of plant material by atomic spectrometric methods. **Anal. Chim. Acta**, v. 358, p. 85-94, 1998.

HOENING, M.; KERSABIEC, A-M. Sample preparation steps for analysis by atomic spectroscopy methods: present status. **Spectrochim. Acta, Part B**, v. 51, p. 1297-1307, 1996.

HUA, K. M.; KAY, M.; INDYK, H. E. Nutritional element analysis in infant formulas by direct dispersion and inductively coupled plasma-optical emission spectrometry. **Food Chem.**, v. 68, p. 463-470, 2000.

HURLEY, W. L. Milk composition. [s. l.]. Disponível em: [http://www.fao.org/docstore/health/health_2000_001.pdf](#). Acesso em: 18 abr. 2001.

IYENGAR, G.V.; WOLF, W. R.; GREENBERG, R. R.; DEMIRALP, R. Mixed total diet slurry as a prospective reference material. **Fresenius' J. Anal. Chem.**, v. 348, p. 426-429, 1994.

JENSEN, R. G. **Handbook of milk composition**. Academic Press, 1995. cap. 7, minerals, ions, and trace elements in milk. p. 577-661.

JORHEM, L. Determination of lead, cadmium, zinc, copper, and iron in foods by atomic absorption spectrometry after microwave digestion: NMKL collaborative study. **J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.**, v. 83, n. 5, p. 1189-1203, 2000.

JORHEM, L. Determination of metals in foodstuffs by atomic absorption spectrometry after dry ashing: NMKL Interlaboratory study of lead, cadmium, zinc, copper, iron, chromium, and nickel. **J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.**, v. 76, n. 4, p. 798-813, 1993.

JORHEM, L. Dry ashing, sources of error, and performance evaluation in AAS. **Mikrochim. Acta** v. 119, p. 211-218, 1995.

KANIAS, G. D. Neutron activation analysis of nutrient elements in dried packaged food and comparison with recommended daily allowances. **J. Trace Microprobe Tech.**, v. 17, n. 1, p. 111-122, 1999.

KARADJOVA, I.; GIROUSI, S.; ILIADOU, E.; STRATIS, I. Determination of Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ni and Pb in milk, cheese and chocolate. **Mikrochim. Acta**, v. 134, p. 185-191, 2000.

KINGSTON, H. M.; JASSIE, L. B. Microwave energy for acid decomposition at elevated temperatures and pressures using biological and botanical samples. **Anal. Chem.**, v.58, p. 2534-2541, 1986.

KNAPP, G. Mechanized techniques for sample decomposition and element preconcentration. **Mikrochim. Acta** [Wien] II, p. 445-455, 1991.

KRUG, F. J. Métodos de decomposição de amostras. In: III WORKSHOP SOBRE PREPARO DE AMOSTRAS. São Carlos-SP. 23 - 27 out. 2000.

KRUSHEVSKA, A.; BARNES, R. M.; AMARASIRIWARADENA, C. Decomposition of biological samples for inductively coupled plasma atomic emission spectrometry using an open focused microwave digestion system. **Analyst**, v. 118, p. 1175-1181, 1993.

KRUSHEVSKA, A.; BARNES, R. M.; AMARASIRIWARADENA, C. J. ; FONER, H. ; MARTINES, L. Comparison of sample decomposition procedures for the determination of zinc in milk by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 7, p. 851-858, 1992.

KUBRAKOVA, I. V.; KUDINOVA, T. F.; STAVNIVENKO, E. B.; KUZ'MIN, N. M. Microwave radiation as a factor intensifying sample preparation: analysis of samples with an organic matrix. **J. Anal. Chem.**, v. 52, n. 6, p. 522-527, 1997.

KUSS, H. M. Applications of microwave digestion technique for elemental analyses. **Fresenius' J. Anal. Chem.**, v. 343, p. 788-793, 1992.

LAVI, N.; ALFASSI, Z. B. Determination of trace amounts of cadmium, cobalt, chromium, iron, molybdenum, nickel, selenium, titanium, vanadium and zinc in blood and milk by neutron activation analysis. **Analyst**, v. 115, p. 817-822, 1990.

LINDER, M.C. Nutritional biochemistry and metabolism with clinical application. 2. ed. International Edition. East Norwalk: CT. Prentice-Hall International Inc., 1991. cap. 6, nutrition and metabolism of the major minerals – cap. 7, nutrition and metabolism of the trace elements. p. 191-276.

MAGALHÃES, C.E.C.; ARRUDA, M.A.Z. Amostragem de suspensões: emprego da técnica na análise direta de amostras. **Quím. Nova**, v. 21, n. 4, p. 459-466, 1998.

MAIHARA, V.A.; FÁVARO, D.I.T.; SILVA, V.N.; GONZAGA, I. B.; SILVA, V. L.; CUNHA, I.L.L.; VASCONCELLOS, M.B.A.; COZZOLINO, S. M.F. Determination of mineral constituents in duplicate portion diets of two university student groups by instrumental neutron activation. **J. Radioanal. Nucl. Chem.**, v. 249, n. 1, p. 21-24, 2001.

MAIHARA, V. A.; GALLORINI, M.; VASCONCELLOS, M. B. A. Radiochemical separation for the certification of some trace elements in biological reference materials by neutron activation analysis. **J. Radioanal. Nucl. Chem.**, v. 198, n. 2, p. 343-348, 1995.

MAIHARA, V. A.; VASCONCELLOS, M. B. A.; CORDEIRO, M. B.; COZZOLINO, S. M. F. Estimate of toxic element intake in diets of pre-school children and elderly collected by duplicate portion sampling. **Food Addit. Contam.**, v. 15, n. 7, p. 782-788, 1988.

MATUSIEWICZ, H.; STURGEON, R. E.; BERMAN, S. S. Trace element analysis of biological material following pressure digestion with nitric acid-hydrogen peroxide and microwave heating. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 4, p. 323-327, 1989.

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.**, v. 65, p. 245-252, 1999.

MINGORANCE, M. D.; VAZQUEZ, M. L. P.; LACHICA, M. Microwave digestion methods for the atomic spectrometric determination of some elements in biological samples. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 8, p. 853-858, 1993.

MOORE, G. L. Introduction to inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. Amsterdam: Elsevier, 1989. v.3, 340 p (Analytical spectroscopy library).

MORENO-TORRES, R.; NAVARRO, M.; RUIZ-LÓPEZ, M. D.; ARTACHO, R.; LÓPEZ, C. A mineralization procedure for determining magnesium in milk. **Lebensm.-Wiss. Technol.**, v. 33, p. 397-400, 2000.

MURCIA, M. A.; VERA, A.; MARTÍNEZ-TOMÉ, M.; MUNOZ, A.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M.; ORTIZ-GONZÁLEZ, R. Fast determination of the Ca, Mg, K, Na and Zn contents in milk and nondairy imitation milk using ICP-AES without mineralization stage. **Lebensm.-Wiss. Technol.**, v. 32, p. 175-179, 1999.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS & TECHNOLOGY (NIST) **Certificate of Analysis: Non Fat Milk Powder SRM 1549**, Washington D. C., November, 1999.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS & TECHNOLOGY (NIST) **Certificate of Analysis: Whole Milk Powder SRM 8435**, Washington D. C., April, 1999.

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

NOVOZAMSKY, I.; LEE, V. H.; HOUBA, V. J. G. Sample digestion procedures for trace element determination. **Mikrochim. Acta**, v. 119, p. 183-189, 1995.

NOVOZAMSKY, I.; LEE, V. H.; HOUBA, V. J. G. Sample digestion procedures for trace element determination. **Mikrochim. Acta**, v. 119, p. 183-189, 1995.

OLES, P. J.; GRAHAM, W. M. Microwave acid digestion of various food matrixes for nutrient determination by atomic absorption spectrophotometry. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 74, n. 5, p. 812-814, 1991.

OLIVEIRA, C. C.; SARTINI, R. P.; ZAGATTO, E.A.G. Microwave-assisted sample preparation in sequential injection: spectrophotometric determination of magnesium, calcium and iron in food. **Anal. Chim. Acta**, v. 413, p. 41-48, 2000.

ONG, C.C. Direct analysis of plant minerals and comparison of extraction process using ICP-AES. **Food Chem.**, v. 45, p. 145-149, 1992.

PEDRO, N. A. R. Determinação de nutrientes minerais em alguns alimentos por ICP-AES. 1998. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

PITOCHELLI, J. Multiple comparisons tests. [S.l.]. 2001 Disponível em : <<http://www.anselm.edu/homepage/jpitocch/anova/multcomp.html>>. Acesso em: 27 ago. 2002.

REID, H. J.; GREENFIELD, S.; EDMONDS, T. E. Investigation of decomposition products of microwave digestion of food samples. **Analyst**, v. 120, p. 1543-1548, 1995.

RODUSHKIN, I.; RUTH, T.; HUHTASAARI, A. Comparison of two digestion methods for elemental determinations in plant material by ICP techniques. **Anal. Chim. Acta**, v. 378, p. 191-200, 1999.

ROJAS, R.M.; LOPEZ, M.A; COSANO, G.Z. Mineral content in Spanish sterilized milk. **Rev.Esp.Cien.Tecnol.Alim.**, v. 34, n. 3, p. 323-332, 1994.

ROMERO, C. D. Pérdidas de metales pesados en el proceso de mineralización por via seca. **Alimentaria**, v. 29, p. 29-31, 1992.

SÃO PAULO (Estado). Decreto nº 44.569, de 22 de dezembro de 1999. Institui o Projeto Estadual do Leite “VIVALEITE” dentro do Programa Estadual de Alimentação e Nutrição para populações carentes, em substituição ao Programa Campo/Cidade-Leite, de que trata o Decreto nº 41.612, de 7 de março de 1997, e dá providências correlatas. DOE, São Paulo, SP, 23 dez. 1999. Seção 1, p. 2.

SCHNITZER, G.; SOUBELET, A.; TESTU, C.; CHAFEY, C. Comparison of open and closed focussed microwave digestions in view of total mercury determination by cold vapour atomic absorption spectrometry. **Microchim. Acta**, v. 119, p. 199-209, 1995.

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.**, v. 68, n. 1, p. 95-99, 2000.

SING, R. Direct sample insertion for inductively coupled plasma spectrometry. **Spectrochim. Acta, Part B**, v. 54, p. 411-441, 1999.

SKURIKHIN, I. M. Methods of analysis for toxic elements in foods. Part IV. General method of ashing for the determination of toxic elements. **J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.**, v. 76, n. 2, p. 257-262, 1993.

SMITH, F. E.; ARSENAULT, E. A. Microwave-assisted sample preparation in analytical chemistry. **Talanta**, v. 43, p. 1207-1268, 1996.

SUBRAMANIAN, K. Determination of metals in biofluids and tissues: sample preparation methods for atomic spectroscopic techniques. **Spectrochim. Acta, Part B**, v. 51, p. 291-319, 1996.

SUDDENDORF, R. F.; COOK, K.K. Inductively coupled plasma emission spectroscopy determination of nine elements in infant formula: collaborative study. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** v. 67, n. 5, p. 985-992, 1984.

SUN, D.H.; WATERS, J. K.; MAWHINNEY, T. P. Determination of thirteen common elements in foods samples by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry: comparison of five digestion methods. **J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.**, v. 83, n. 5, p. 1218-1224, 2000.

SUN, D.H.; WATERS, J.K.; MAWHINNEY, T. P. Determination of boron in plants and plant-derived foods by ultrasonic nebulization-inductively coupled plasma atomic emission spectrometry with addition of manitol. **J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.**, v. 80, n. 1, p. 20-24, 1997. (a)

SUN, D.H.; WATERS, J.K.; MAWHINNEY, T. P. Microwave digestion for determination of aluminum, boron, and 13 other elements in plants y inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.**, v. 80, n. 3, p. 647-650, 1997. (b)

SUN, D.H.; WATERS, J.K.; MAWHINNEY, T.P. Microwave digestion with $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{O}_2\text{-HF}$ for the determination of total aluminum in seafood and meat by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **J. Agric. Food Chem.**, v. 45, p. 2115-2119, 1997. (c)

TAHÁN, J. E.; SÁNCHEZ, J. M.; GRANADILLO, V. A.; CUBILLÁN, H. S.; ROMERO, R. A. Concentration of total Al, Cr, Cu, Fe, Hg, Na, Pb and Zn in comercial canned seafood determined by atomic spectrometric means after mineralization bby microwave heating. **J. Agric. Food Chem.**, v. 43, p. 910-915, 1995.

TINGGI, U.; REILLY, C. ; PATTERSON, C. Determination of manganese and chromium in foods by atomic absorption spectrometry after wet digestion. **Food Chem.**, v. 60, n. 1, p. 123-128, 1997.

TODOLÍ, J. L.; GRAS, L.; HERNANDIS, V.; MORA, J. Elemental matrix effects in ICP-AES. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 17, p. 142-169, 2002.

TODOLÍ, J. L.; MERMET, J. M. Acid interferences in atomic spectrometry: analyte signal effects and subsequent reduction. **Spectrochim. Acta, Part B**, v. 54, p. 895-929, 1999.

TOLONEN, M. **Vitaminas y minerales en la salud y la nutrición**. Editorial Acribia, 1995.

TRIOLA, M. F. Introdução à estatística. Rio de Janeiro. LTC – Livros Técnicos e Científicos, 1998. cap. 11, análise de variância. p. 280-289.

VIEIRA, S. Introdução à bioestatística. Rio de Janeiro, RJ: Campus, 1981. cap. 12, teste t – cap. 13, análise de variância p. 125-156.

VOCABULÁRIO INTERNACIONAL DE METROLOGIA. Portaria INMETRO n. 029, de 10 de março de 1995. Ministério da Indústria, do Comércio e do Turismo resolve adotar no Brasil a nova versão do Vocabulário de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia.

WELZ, B.; SPERLING, M. **Atomic absorption spectrometry**. 3. ed. Wiley-vch, 1999. cap. 10, applications of AAS, p. 575-769.

WILLIAMS, S.R. **Fundamentos de Nutrição e Dietoterapia**. 6. ed, Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. cap. 8, minerais. P. 144-169.

ZACHARIADIS, G. A.; STRATIS, J. A.; KANIOU, I.; KALLIGAS, G. Critical comparison of wet and dry digestion procedures for trace metal analysis of metal and fish tissues. **Microchim. Acta**, v. 119, p. 191-198, 1995.

ZHOU, C. Y.; WONG, M. K.; KOH, L.L.; WEE, Y.C. Microwave digestion of biological samples with tetramethylammonium hydroxide and ethylenediaminetetraacetic acid for element determination. **Talanta**, v. 43, p. 1061-1068, 1996.

ZIKOVSKY, L.; SOLIMAN, K. Determination of daily dietary intakes of Br, Ca, Cl, Co and K in food in Montreal, Canada, by neutron activation analysis. Short communication. **J. Radioanal. Nucl. Chem.**, v. 247, n. 1, p. 171-173, 2001.