



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
MESTRADO EM QUÍMICA**

MIRLA JANAINA AUGUSTA CIDADE

**DETERMINAÇÕES DE MACROS E MICRO-CONSTITUINTES EM SORO DE
LEITE E DE SUAS DISPONIBILIDADES NUTRICIONAIS POR ICP OES**

**Boa Vista
2011**

MIRLA JANAINA AUGUSTA CIDADE

**DETERMINAÇÕES DE MACROS E MICRO-CONSTITUINTES EM SORO DE
LEITE E DE SUAS DISPONIBILIDADES NUTRICIONAIS POR ICP OES**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Química do Programa de Pós-Graduação em Química – PPGQ da Universidade Federal de Roraima como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Química na área de concentração Análise de Traços em Matrizes Ambientais.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Teresa Maria Fernandes de Freitas Mendes

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Solange Cadore

**Boa Vista
2011**

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Roraima

C568d Cidade, Mirla Janaina Augusta.
Determinações de macros e micros-constituintes em soro de leite e de suas disponibilidades nutricionais por ICP OES/ Mirla Janaina Augusta Cidade. – Boa Vista, 2011.
73f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Teresa Maria Fernandes de Freitas Mendes.

Co-Orientadora: Profa. Dra. Solange Cadore.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Roraima, Programa de Pós-Graduação em Química.

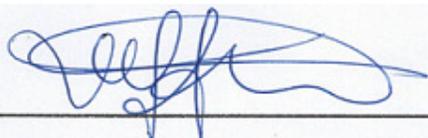
1 – Soro de leite. 2 – Metais. 3 – Introdução direta. 4 – Ultrassom. 5 – Disponibilidade. I – Título. II – Mendes, Teresa Maria Fernandes de Freitas. (orientadora)

CDU – 637.142

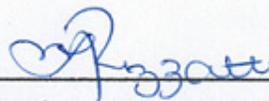
MIRLA JANAINA AUGUSTA CIDADE

**DETERMINAÇÕES DE MACROS E MICRO-CONSTITUINTES EM SORO DE
LEITE E DE SUAS DISPONIBILIDADES NUTRICIONAIS POR ICP OES**

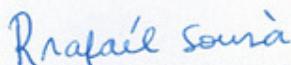
Dissertação apresentada como pré-requisito para conclusão do Curso de Mestrado em Química pela Universidade Federal de Roraima, defendida em 11 de fevereiro de 2011 e avaliada pela seguinte banca examinadora:



Prof.ª. Dr.ª. Teresa Maria Fernandes de Freitas Mendes
Orientadora/Departamento de Química/UFRR



Prof.ª. Dr.ª. Ivanise Maria Rizzatti
Departamento de Química/UERR



Prof. Dr. Rafael Arromba de Sousa
Departamento de Química/UFJF

Dedico às pessoas que mais amo:

Meus pais Marcenita e Hercir pela vida, amor, sacrifício e constante incentivo;

A minha irmã Yanne pela amizade e incentivo.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Teresa Maria Fernandes de Freitas Mendes, pela dedicação, paciência, amizade e contribuição nesta etapa de minha formação;

À minha co-orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Solange Cadore, pela dedicação, amizade e contribuição nesta etapa de minha formação;

Ao Prof. Dr. Nivaldo Baccan pelos esclarecimentos e sugestões;

Ao Prof. Dr. Jarbas Rohwedder e ao Prof. Dr. Henrique Eduardo Bezerra da Silva, pelo incentivo, amizade e empenho pelo sucesso dos alunos;

Aos colegas de mestrado Vânia, Maria da Consolação, Viviane, Simone, Isaura, Leovergildo, José, Francisco e Carlos pelo apoio e companheirismo;

Aos colegas do grupo de espectrometria atômica, do Instituto de Química da UNICAMP: Sabrina, Greice, Mario, Rafael e Emanuelli, pela colaboração em diversos momentos durante a realização deste trabalho, em especial, à Andrea pelo esclarecimento, dedicação, sugestões e auxílio na operação do ICP OES, durante todo o desenvolvimento desse trabalho;

A técnica, Daiana, pela ajuda e amizade;

Às amigas e companheiras de quarto, Janete Motta e Carolina Matos agradeço pelo carinho, paciência nas horas de estresse, apoio principalmente quando estava longe de vocês, e por tornarem nosso convívio inesquecível;

Ao programa PROCAD/CAPES, pelo apoio financeiro e por colaborar com o desenvolvimento desse trabalho em outra instituição de ensino e pesquisa.

A todos, muito obrigada!

RESUMO

Neste trabalho foram desenvolvidos métodos para a quantificação de Co, Mo, Mn, Cu Fe, Zn, Mg, Na, Ca e K por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) em amostras de soro de leite integral e leite desnatado, obtidas por coagulação enzimática e por coagulação ácida. As condições instrumentais foram previamente estabelecidas pela avaliação da robustez do plasma. O método desenvolvido por digestão ácida em chapa de aquecimento foi utilizado como referência, cujos resultados mostraram Co, Mo, Mn, Cu e Fe abaixo dos seus LOQs, desvios padrão relativos (RSDs) abaixo de 10 % e recuperações entre 90 e 110 % para a maioria dos elementos. Os resultados obtidos através do método de introdução direta apresentaram recuperações entre 90 e 110 % para os elementos estudados e RSDs inferiores a 10 %. Porém, quando comparados com método de referência (teste **F** e **t**, 95 % de confiança), revelaram diferenças significativas entre as concentrações, sendo observadas também interferências de matriz. A fim de minimizar esses efeitos, foi feita a sonicação prévia das amostras. As concentrações obtidas com o uso do banho de ultrassom foram similares às obtidas pelo método de referência (teste **F** e **t**, com 95 % de confiança), mostrando que o método é simples, rápido e eficiente para a quantificação dos elementos estudados em amostras de soro de leite. O método utilizando o banho de ultrassom foi utilizado para quantificação dos elementos em diferentes amostras de soro de leite, apresentando RSDs abaixo de 10 % e recuperações entre 90 e 110 % e que as concentrações para o Mg, Na, Ca e K não apresentam diferenças significativas (ANOVA, 95 % de confiança) entre as diferentes amostras, independente da coagulação empregada no preparo do soro de leite e do tipo de leite utilizado. Estudos relacionados à disponibilidade dos elementos também foram conduzidos, revelando as frações disponíveis nas amostras de soro de leite na faixa de 4,2 a 5,5 % para o Mg, 3,0 a 7,4 % para o Na, 12,3 a 14,7 % para o Ca e 5,1 a 5,8 % para o K. Além disso, as frações disponíveis determinadas para o Ca e para o K em todas as amostras, independentemente das suas concentrações no soro de leite e do tipo de coagulação empregada no seu preparo, não mostraram diferenças significativas (ANOVA, 95 % de confiança). Através desse estudo, espera-se contribuir para o entendimento da composição inorgânica e desses elementos no soro de leite para o organismo humano.

Palavras - chave: soro de leite, metais, introdução direta, ultrassom, disponibilidade.

ABSTRACT

Methods for quantification of the elements of Co, Mo, Mn, Cu, Fe, Zn, Mg, Na, Ca and K by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES) in whey samples were developed. Instrumental conditions were previously established by evaluation of plasma robustness. The method of acidic digestion using a hot plate was employed as a reference method, in which Co, Mo, Mn, Cu and Fe were not detected. The relative standard deviation, RSD, was lower than 10 % and the recoveries were between 90-110 % for the most elements. The results obtained by direct introduction have presented recoveries between 90-110% for the studied elements and the values of RSD were lower than 10 %. However, when compared with the reference method (test **F** and **t** at 95 % confidence level) showed significant differences between their concentrations and it was also observed matrix interferences. In order to minimize these effects, the samples were previously submitted to an ultrasound treatment. The concentration values obtained with this treatment were similar to the concentration values obtained by reference method (test **F** and **t** at 95 % confidence level), showing that the method is simple, fast and efficient for the quantification of the elements studied in samples of whey. The method using ultrasound was applied to quantify the elements in different samples of whey, featuring RSD lower than 10 % and recoveries between 90-110%. The results showed that the concentration of Mg, Na, Ca and K are independent of both, the kind of coagulation and the type of milk used in the preparation of whey (ANOVA, 95 % confidence level) for all the samples. The bioaccessibility studies of minerals present in whey samples were also carried out and it was verified that the bioaccessibility fractions of whey were between 4.2-5.5 % for Mg, 3.0-7.4 % for Na, 12.3-14.7 % for Ca and 5.1-5.8 % for K. Ca and K did not show significant differences (ANOVA, 95 % confidence level) for all the samples independent of the kind of preparation or milk used. Through this study, it was expected to contribute to understanding the inorganic composition of these elements in whey for the human.

Key words: whey, metals, direct introduction, ultrasound, available.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1:	Seção transversal de uma tocha de quartzo e do plasma formado usado em ICP OES.....	23
Figura 3.2:	Esquema dos nebulizadores: (a) <i>cross-flow</i> ; (b) <i>conespray</i>	25
Figura 3.3:	Esquema das câmaras de nebulização: (a) duplo-passo; (b) ciclônica	26
Figura 3.4:	Mecanismo de observação da radiação emitida do plasma em instrumentos que permitem a dupla visão, axial e radial.....	26
Figura 5.1:	Efeito da variação da vazão do gás de nebulização sobre a razão Mg II/Mg I na potência da rádio-frequência de 1,3 kW nos sistemas CF-DP e CS-CC: (a) configuração axial, (b) configuração radial.....	44
Figura 5.2:	Efeito da variação da potência da rádio-frequência sobre a razão Mg II/Mg I, utilizando vazão do gás de nebulização a $0,6 \text{ L min}^{-1}$ e $0,7 \text{ L min}^{-1}$ nos sistemas CF-DP e CS-CC, respectivamente: (a) configuração axial, (b) configuração radial.....	46
Figura 5.3:	Efeito da variação vazão do gás auxiliar sobre as razões Mg II/Mg I usando a potência da rádio-frequência a 1,35 kW e as vazões do gás de nebulização a $0,6 \text{ L min}^{-1}$ e $0,7 \text{ L min}^{-1}$ nos sistemas CF-DP e CS-CC, respectivamente: (a) configuração axial, (b) configuração radial.....	47
Figura 5.4:	Variação do TOC com o volume de HNO_3 adicionado na amostra CEI no desenvolvimento do método CH (n=3).....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1:	Composição inorgânica do soro de leite ácido e doce (mg/100 mL de soro) obtidas dos leites em pó e do leite fluido.....	20
Tabela 4.1:	Condições de operação do ICP OES.....	35
Tabela 4.2:	Linhas espectrais e comprimentos de onda utilizados para as determinações das espécies metálicas.....	35
Tabela 5.1:	Sensibilidades, RSDs (%), R^2 do método ID, obtidos por curvas de adição de analito na amostra CEI, usando os sistemas CF-DP e CS-CC e os valores de F e t calculados entre as sensibilidades (n = 3).....	48
Tabela 5.2:	BECs, LODs e LOQs (mg L^{-1}) do método ID para as espécies estudadas usando a amostra CEI e o sistema CS-CC.....	50
Tabela 5.3:	BECs, LODs e LOQs (mg L^{-1}) do método CH para as espécies estudadas usando a amostra CEI e o sistema CS-CC.....	52
Tabela 5.4:	Concentrações (mg L^{-1}) e recuperações (%) com os seus RSDs (%) obtidos pelo uso do método CH na amostra CEI (n=3).....	52
Tabela 5.5:	Sensibilidades, RSD (%) e R^2 no método ID obtidos por curvas de adição de analito na amostra CEI e curvas analíticas em meio aquoso e valores de F e t calculados entre as sensibilidades (n = 3).....	53
Tabela 5.6:	Concentrações (mg L^{-1}), recuperações (%) e RSDs (%) obtidos pelo uso do método ID na amostra CEI (n=3).....	54
Tabela 5.7:	Valores de F e t calculados entre as concentrações obtidas através dos métodos CH e ID na amostra CEI (n=3).....	55
Tabela 5.8:	BECs, LODs e LOQs (mg L^{-1}) do método US para as espécies estudadas usando a amostra CEI e o sistema CS-CC.....	56

Tabela 5.9:	Sensibilidades, RSDs (%), R^2 do método US obtidos por curvas de adição de analito na amostra CEI e curvas analíticas em meio aquoso e valores calculados para os testes F e t (n=3).....	57
Tabela 5.10:	Concentrações (mg L^{-1}), recuperações (%) e RSDs (%) obtidas pelo uso do método US na amostra CEI (n = 3).....	58
Tabela 5.11:	Valores de F e t calculados entre as concentrações obtidos com o uso dos métodos CH e US na amostra CEI (n=3).....	58
Tabela 5.12:	Concentrações (mg L^{-1}), recuperações (%) e RSDs (%) obtidas por US em diferentes amostras de soro de leite (n=3).....	60
Tabela 5.13:	Comparação entre as concentrações (mg L^{-1}) obtidas neste estudo com valores da literatura.....	61
Tabela 5.14:	Frações disponíveis (% , m/m) de soro de leite com seus respectivos RSDs (%) determinadas nas diferentes amostras (n=3)	62

LISTA DE ABREVIações

ANOVA: do inglês *Analysis of Variance* (Análise de Variância);

AsI: Arsênio inorgânico;

AsT: Arsênio Total;

BEC: do inglês *Background Equivalent Concentration* (Concentração Equivalente de Fundo);

CAD: Soro de Leite Desnatado obtido por coagulação ácida;

CAI: Soro de Leite Integral obtido por coagulação ácida;

CED: Soro de Leite Desnatado obtido por coagulação enzimática;

CEI: Soro de Leite Integral obtido por coagulação enzimática;

CF-DP: Nebulizador *Cross-Flow* Acoplado a uma Câmara de Nebulização Duplo Passo;

CH: Digestão em Chapa de Aquecimento;

CS-CC: Nebulizador *Conespray* Acoplado a uma Câmara de Nebulização Ciclônica;

DMS: Diferenças Menos Significativas;

ETAAS: do inglês *Electrothermal Atomic Spectrometry* (Espectrometria de Absorção Atômica por Atomização Eletrotérmica);

FAAS: do inglês *Flame Atomic Absorption Spectrometry* (Espectrometria de Absorção Atômica por Chama);

HG-AAS: do inglês *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry* (Espectrometria de Absorção Atômica por Geração de Hidreto);

ICP-MS: do inglês *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry* (Espectrometria de Massas com Plasma Acoplado Indutivamente);

ICP OES: do inglês *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry* (Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado);

ID: Introdução direta;

LOD: do inglês *Limite of Detection* (Limite de Detecção);

LOQ: do inglês *Limite of Quantification* (Limite de Quantificação);

Mg II/ Mg I: Razão entre as intensidades de emissão do Mg iônico a 280,2 nm e do Mg atômico a 285 nm;

NAZ: o inglês *Normal Analytical Zone* (Zona Analítica Normal);

ND: Não Detectado;

TOC: do inglês *Total Organic Carbon* (Carbono Orgânico Total);

R²: Coeficiente de Correlação;

RSD: do inglês *Relative Standard Deviation* (Desvio Padrão Relativo);

US: Uso do Banho de ultrassom;

USDA: do inglês *United States Department of Agriculture* (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos).

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	OBJETIVOS.....	17
2.1	Objetivo Geral	17
2.2	Objetivos Específicos.....	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1	Soro de Leite.....	18
3.1.1	Constituintes Inorgânicos no Soro de Leite.....	19
3.2	Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Acoplado Indutivamente	22
3.3	Uso do Banho de Ultrassom.....	28
3.4	Disponibilidade dos Constituintes Inorgânicos.....	31
4	PARTE EXPERIMENTAL.....	34
4.1	Materiais e Reagentes.....	34
4.2	Instrumentação.....	34
4.3	Amostras Estudadas.....	36
4.4	Preparo das Amostras de Soro de Leite.....	36
4.4.1	Coagulação Enzimática.....	36
4.4.2	Coagulação Ácida.....	37
4.5	Tratamento das Amostras de Soro de Leite.....	37
4.5.1	Digestão Ácida em Chapa de Aquecimento (CH).....	37
4.5.2	Introdução Direta (ID).....	38
4.5.3	Uso do Banho de Ultrassom (US).....	38
4.6	Otimização Instrumental.....	39
4.6.1	Otimização das Condições Robustas.....	39
4.6.2	Escolha dos Sistemas de Nebulização.....	40
4.7	Estudos da Disponibilidade dos Constituintes Inorgânicos em Soro de Leite.....	40
4.8	Figuras de Mérito.....	41
4.9	Comparação Entre os Resultados.....	42
4.10	Tratamento dos Resíduos.....	43
5	RESULTADOS E DISCUSÕES.....	44

5.1	Otimização Instrumental.....	44
5.1.1	Condições Robustas.....	44
5.1.2	Avaliação do Desempenho dos Sistemas de Nebulização Estudados.....	48
5.2	Digestão Ácida das Amostras em Chapa de Aquecimento (CH)	50
5.3	Introdução Direta (ID).....	53
5.4	Uso do Banho de Ultrassom (US).....	55
5.5	Aplicação do Método US em Diferentes Amostras de Soro de Leite.....	59
5.6	Disponibilidade dos Constituintes Inorgânicos em Soro de Leite.....	62
6	CONCLUSÕES.....	64
7	REFERÊNCIAS.....	66

1 INTRODUÇÃO

O soro de leite pode ser definido como a parte líquida do leite obtida, após a precipitação da caseína (proteína do tipo fosfoproteína), seja para obtenção desta proteína, seja na produção de queijos. A composição do soro varia em função do leite que lhe deu origem e do processo de fabricação do queijo, sendo classificado em dois tipos básicos: soro ácido e soro doce (MELO NETO *et al.*, 2006).

De uma maneira geral, pode-se considerar que o soro representa 85 a 95 % do volume do leite e retém aproximadamente 55 % dos seus nutrientes, dentre os quais, destacam-se a lactose (4 a 5 %), as proteínas solúveis (0,6 a 0,8 %), os lipídios (0,4 a 0,5 %) e os constituintes inorgânicos (8 a 10 % do extrato seco). O sódio e o potássio representam mais da metade dos constituintes inorgânicos presentes no soro de leite. Existem também compostos orgânicos como o ácido láctico, ácido cítrico, compostos nitrogenados não-protéicos (uréia e ácido úrico) e vitaminas do complexo B (LEITE, 2006).

O soro foi considerado durante muito tempo como um resíduo sem qualquer valor comercial, sendo descartado como efluente ou incorporado em rações para animais. Porém, esse procedimento está sendo revisto em função de suas propriedades funcionais e nutricionais. Nas indústrias alimentícias, o soro de leite vem sendo empregado como matéria-prima em inúmeros produtos, desde bebidas lácteas até sorvetes e bolos (TREMARIN, 2007).

Observando o crescente emprego do soro de leite, é apresentado um estudo para determinação de alguns dos seus nutrientes inorgânicos, bem como das suas frações nutricionais disponíveis, visto que são poucos os trabalhos publicados que tratam destes aspectos.

Além disso, a resolução nº 360 de 23 de dezembro de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) exige das indústrias a indicação apenas do teor Na nos rótulos dos alimentos. Mesmo assim, os teores de Ca, Fe, Zn, I, P, Cu, Se, Mo, Cr e Mg são dados como declarações voluntárias pelos fabricantes. Logo, essas espécies inorgânicas também devem ser monitoradas.

As técnicas instrumentais mais utilizadas para a determinação dos elementos metálicos em amostras orgânicas são a espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS), espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica

(ETAAS), espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES) e a espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS). Estas técnicas requerem o tratamento da amostra, necessário para evitar problemas relacionados às concentrações elevadas de matéria orgânica.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um método analítico simples e rápido sem a necessidade da digestão ácida para a determinação de constituintes inorgânicos no soro de leite, empregando-se para tal propósito a técnica de ICP OES. Nesse estudo, foram avaliados diferentes tipos de soro de leite, provenientes de leite integral e do leite desnatado.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver um método analítico simples e rápido sem a necessidade da digestão ácida para determinação dos macros (Mg, Na, K e Ca) e microconstituintes (Co, Mo, Mn, Cu, Fe e Zn) em soro de leite por ICP OES.

2.2 Objetivos Específicos

Otimizar as condições instrumentais de vazão do gás de nebulização, potência do plasma, vazão do gás auxiliar, uso do padrão interno e configuração de tocha do ICP OES, visando a determinação das espécies metálicas sem necessidade de digestão ácida da amostra.

Comparar o desempenho analítico do nebulizador *cross-flow* acoplado a uma câmara de nebulização duplo passo (CF-DP) com o nebulizador *conespray* acoplado a uma câmara de nebulização ciclônica (CS-CC).

Comparar a eficiência analítica do procedimento por introdução direta das amostras e do procedimento com o uso prévio do banho de ultrassom com o método de digestão ácida em chapa de aquecimento como pré-tratamento de referência.

Confrontar as concentrações dos elementos estudados nas amostras de soros de leite integral obtidos por coagulação enzimática (CEI) e ácida (CAI) e dos soros de leite desnatado obtidos por coagulação enzimática (CED) e ácida (CAD).

Determinar as frações disponíveis dos elementos em estudo na amostras de soro de leite: CEI, CAI, CED e CAD.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Soro de leite

O soro de leite é definido como um subproduto da fabricação de queijo e que representa aproximadamente 85 a 95 % do volume total do leite, dependendo do tipo de queijo produzido (TEIXEIRA; FONSECA, 2008).

Durante algum tempo o soro foi considerado um resíduo pelas indústrias de laticínios, sendo descartado nos efluentes. Isto representava um importante problema ambiental, pois dependendo do processo utilizado na fabricação de queijos, são obtidos valores de 30.000 a 60.000 mg L⁻¹ em Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO₅). Porém, este subproduto vem sendo aproveitado como matéria-prima na fabricação de diversos produtos, devido as suas características nutricionais, cujo consumo e utilização atenuam problemas relacionados à poluição ambiental (RÉVILLION; BRANDELLI; AYUB, 2000; MELO NETO *et al.*, 2006).

Os principais tipos de preparo/obtenção do soro são através dos processos (SGARBIERI, 2004; ROMAN; SGARBIERI, 2005):

- a) enzimático (enzima quimosina ou pepsina), resultando no soro doce e em coágulos de caseína, matéria-prima para a produção de queijos;
- b) ácido, resultando no soro ácido e em caseína isoelétrica que é transformada em caseinatos;
- c) separação física das micelas de caseína (microfiltração ou ultrafiltração), obtendo-se o soro e um concentrado em micelas e proteínas.

As principais proteínas do soro são a β -lactoglobulina e a α -lactoalbumina que representam de 70 a 80 % das proteínas do soro; outras proteínas também são abundantes como a albumina, imunoglobulinas, lactoperoxidase e lactoferrina (WALZEM; DILLARD; GERMAN, 2002).

São inúmeros os artigos que destacam os efeitos positivos das propriedades das proteínas do soro de leite como suplemento alimentar. O soro de leite na forma de concentrado protéico representa uma mistura de proteínas que desempenha um papel relevante na nutrição (fonte de aminoácidos essenciais), sendo favorável à saúde humana e na prevenção de doenças infecciosas, crônicas e/ou degenerativas

(SMITHERS *et al.*, 1996; MCINTOSH; LE LEU, 2001; WALZEM; DILLARD; GERMAN, 2002; ROSANELI *et al.*, 2004).

Sgarbieri (2004) discutiu as vantagens e os benefícios do consumo das proteínas do soro de leite como um suplemento alimentar para atletas e esportistas em geral, concluindo que essas proteínas e os peptídeos, delas derivados, podem desempenhar um papel importante na prevenção de doenças crônicas e degenerativas, além de serem valiosas aliadas dietoterápicas no tratamento de várias doenças.

Haraguchi, Abreu e De Paula (2006) fizeram uma avaliação das propriedades das proteínas do soro, tanto em humanos como em animais. Os autores propuseram um enriquecido de alimentos (por exemplo, bebidas) com as proteínas do soro, com o intuito de facilitar seu consumo por grandes grupos populacionais, para verificar sua real eficácia.

3.1.1 Constituintes Inorgânicos no Soro de Leite

De modo geral, o soro é rico em proteínas, lactose e vitaminas. Os principais minerais presentes são o cálcio, ferro, magnésio, sódio e zinco, cuja composição varia em função do tipo de queijo produzido, dos processos tecnológicos empregados e do leite utilizado (KOSKOWSKI, 1979; MELO NETO *et al.*, 2006; TEIXEIRA; FONSECA, 2008).

Apesar de existir diferenças entre as suas composições médias, o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) apresenta as composições médias dos soros de leite ácido e doce, obtidos do leite em pó e do leite fluido, as quais estão transcritas na Tabela 3.1.

Diante destes aspectos, alguns pesquisadores vêm avaliando a composição inorgânica do soro de leite. Pereira Jr. e Fernandes (2011) estudaram a associação do Se às moléculas orgânicas do soro de leite de búfala e bovino por ETAAS. O soro de leite foi obtido por centrifugação das amostras a 5000 rpm por 60 min a 4 °C. As frações do soro de leite obtidas foram submetidas à análise por cromatografia de exclusão de tamanho com detecção *on-line* ultravioleta; para determinação do Se, as amostras foram liofilizadas e diluídas em 200 µL de HNO₃ a 0,028 mol L⁻¹, usando 5 µg de paládio como modificador químico. As concentrações totais de Se

determinadas para o soro de leite de búfala e bovino foram 254,4 e 250,8 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. O método apresentou recuperações de 101,7 % para soro de leite de búfala e de 81,4% para o soro de leite bovino. Segundo os autores, o Se no leite de búfala está associado às moléculas de massas moleculares altas e baixas, enquanto no leite bovino, está predominantemente associado às moléculas de massas moleculares altas, sendo sua distribuição nos dois tipos de soro de leite significativamente diferentes, devido às diferenças de composição dos leites.

Tabela 3.1: Composição inorgânica do soro de leite ácido e doce (mg/100 mL de soro) obtida do leite em pó e do leite fluido (USDA, 2010).

Elementos	Leite em Pó		Fluido	
	Ácido	Doce	Ácido	Doce
Ca	2054	796	103	47
Fe	1,24	0,88	0,08	0,06
Mg	199	176	10	8
P	1349	932	78	46
K	2289	2080	143	161
Na	968	1079	48	54
Zn	6,31	1,97	0,43	0,13
Cu	0,050	0,070	0,003	0,004
Mn	0,015	0,009	0,002	0,001
Se	27,3	27,2	1,8	1,9

Yüzbaşı *et al.* (2009) quantificaram Pb e Cd por ETAAS e Fe, Cu e Zn por FAAS em amostras de leite, coalhada, coalhada prensada, queijo fresco, requeijão, soro de leite e água de escaldagem do queijo Kaşar procedentes de duas fábricas (denominadas A e B), em Ankara na Turquia, com o objetivo de investigar a influência de cada etapa dos processos de fabricação dos queijos. Os autores observaram que concentração de Pb apresentou um aumento durante o processamento do leite para coalhada em ambas as fábricas, indicando contaminação nesta etapa do processo por este analito. Além disso, durante as transições entre as etapas da coalhada para a coalhada prensada e da coalhada prensada para o queijo fresco, quase todos os elementos apresentaram uma diminuição em suas concentrações, devido às perdas para o soro de leite e para a

água de escaldagem. Entre todas as etapas, o soro de leite foi o produto que apresentou as menores concentrações dos elementos estudados nas duas fábricas. Os autores concluíram que a coagulação do leite é a parte mais sujeita a contaminação e que os diferentes equipamentos e etapas dos processos utilizados nas duas fábricas mostraram efeitos significativos sobre os teores dos elementos estudados.

Ayar, Sert e Akin (2009) quantificaram Al, Pb, Cd, Se e As com o uso da técnica de ICP OES em amostras de leite, manteiga, sorvete, leite em pó, soro de leite em pó, iogurte, iogurte escoado, ayran (iogurte líquido típico da região) e queijo (Branco, Kaşar, Tulum e Lor). O pré-tratamento das amostras consistiu na mineralização assistida por microondas, utilizando 5 mL de HNO₃ a 65 % (v/v), 2 mL de H₂O₂ a 30 % (v/v) e 0,5 a 1,0 g de amostras. Os autores observaram a ocorrência da contaminação por Al nas amostras, a qual poderia ser proveniente dos equipamentos utilizados no processo de fabricação dos produtos a base de leite. Além disso, as amostras de todos os tipos de queijo apresentaram concentrações em Pb superiores aos limites estabelecidos pelo Codex Alimentarius e pela regulação da Comunidade Européia e que as amostras do queijo Tulum apresentaram as maiores concentrações em Cd.

Garcia *et al.* (2006) determinaram Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn por FAAS e Se por fluorimetria em produtos a base de leite de cabras (leite, soro de leite, queijo fresco e queijo meia-cura), produzidos na ilha de Tenerife, avaliando a época, a quantidade de fibras na dieta alimentar das cabras e a região geográfica, em que as amostras foram produzidas. Os autores observaram que, entre as amostras estudadas, o soro de leite apresentou as menores concentrações para todos os elementos, exceto para o Na e que os elementos determinados entre os produtos estudados apresentaram diferenças significativas entre as concentrações. A análise estatística indicou que a época de produção teve uma maior influência sobre as concentrações dos elementos nas amostras, sendo possível diferenciar as amostras de leite e soro das de queijo, ocorrendo apenas uma pequena sobreposição entre as amostras de leite e de soro nos dois tipos de queijo estudados.

Johansen, Vegarud e Skeie (2002) observaram a variação da composição em amostras de soros de leite norueguês, provenientes da fabricação dos queijos do tipo Cheddar e Dutch, através dos parâmetros sólidos totais, lactose, proteínas (β -

lactoglobulina e α -lactoalbumina), gordura, uréia, K, P, Ca, Na e Mg, determinados por ICP OES. Os resultados obtidos foram avaliados de acordo com o tipo de queijo, a região geográfica e a época de produção, mostrando que a composição dos soros estudados varia de acordo com tipo de queijo produzido; os teores de proteínas, gordura, uréia e constituintes inorgânicos variaram significativamente com as estações do ano; a comparação entre as composições do soro de leite do queijo tipo Duth, produzidos em diferentes regiões da Noruega, revelou que o soro procedente da região Norte difere significativamente das demais regiões. Quando comparadas as composições dos soros noruegueses com as de soros produzidos em outros países, foram observadas diferenças quanto aos teores de proteínas e pH.

Martino, Sánchez e Medel (2002) utilizou a técnica de cromatografia líquida de alta resolução associada ao ICP-MS para estudar os padrões de fracionamento de Fe, Cu, Zn, Mn, Sr, I, Br, Ca e Mg em soros obtidos a partir dos diferentes tipos de leite: humano, bovino, UHT-bovino e leite em pó. Os soros foram obtidos por ultra-centrifugação dos diferentes tipos de amostras de leite e a separação das diferentes frações foi realizada por uma coluna de alta pressão, baseada na cromatografia de exclusão por tamanho (coluna TSKgel G 2000 SW_{XL}) acoplada em linha com o ICP-MS para a detecção multielementar. Os autores verificaram que as concentrações dos elementos presentes no soro de leite humano diferem das daquelas observadas nas amostras de soro de leite bovino e concluíram que as diferenças estão relacionadas com as diferentes formas pelas quais os elementos estão ligados às moléculas que constituem os soros e que a biodisponibilidade dos elementos pode ser diferente no soro de leite humano. Os autores sugeriram um estudo mais cuidadoso quanto às características das formulações a base de leite bovino utilizadas para a alimentação humana, especialmente para crianças e recém-nascidos.

3.2 Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Acoplado Indutivamente

A técnica de ICP OES baseia-se na quantificação da radiação eletromagnética emitida, nas regiões do visível e do ultravioleta, por átomos neutros ou íons excitados.

O plasma é um gás parcialmente ionizado onde co-existem elétrons livres e íons positivos em movimento, em um processo contínuo de transferência de energia. As principais vantagens do plasma acoplado indutivamente são as elevadas temperaturas (6000 a 10000 K), bem como a sua densidade de elétrons e íons. As altas temperaturas promovem a dissociação e a ionização das moléculas, diminuindo os efeitos de interferência de matriz (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 1998; GINÉ-ROSIAS, 1998).

O plasma de argônio é formado e mantido por um fluxo de gás argônio em um campo magnético de alta frequência em uma tocha de quartzo. Deste modo, o sistema usado para gerar o plasma é formado pelos componentes principais: o fluxo de argônio, a tocha de quartzo e a bobina de indução magnética, conectada a uma fonte de rádio-frequência.

A Figura 3.1 apresenta a seção transversal de uma tocha de quartzo e do plasma formado usado em ICP OES, em que o fluxo do gás principal de argônio ($12 - 17 \text{ L min}^{-1}$) passa no tubo externo da tocha, sendo responsável pela manutenção do plasma e proteção das paredes da tocha contra a fusão; o fluxo do gás auxiliar no tubo intermediário da tocha tem a função de direcionar o aerossol da amostra para dentro do plasma; o fluxo de gás do nebulizador, introduz a amostra no plasma pelo tubo central da tocha, com o auxílio de um sistema de nebulização (SKOOG, HOLLER; NIEMAN, 1998).

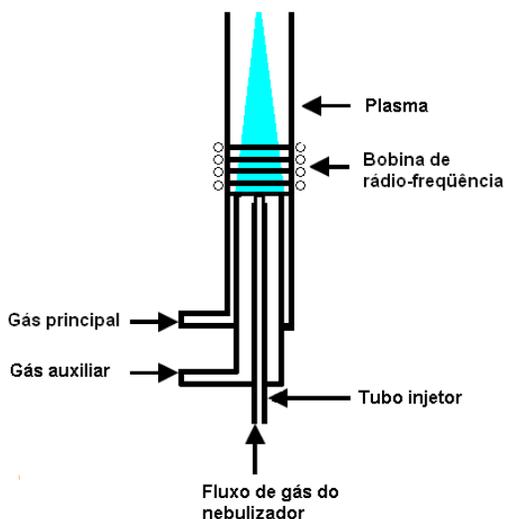


Figura 3.1: Seção transversal de uma tocha de quartzo e do plasma formado usado em ICP OES (BOSS; FREDEEN, 1999).

O sistema de nebulização é composto, em geral, por um nebulizador e uma câmara de nebulização, sendo o nebulizador acoplado a câmara de nebulização. A função básica do nebulizador é de transformar a amostra em solução em um aerossol, constituído por gotículas que variam de 1 a 10 μm de diâmetro, operando a uma vazão de 0,5 a 2 mL min^{-1} , considerando o tempo necessário para realização de uma leitura completa do sinal analítico que varia de 1 a 5 min e depende do sistema de detecção e do número de elementos a serem determinados. Deste modo, o volume de amostra gasto em uma determinação varia de 1 a 10 mL (TODOLÍ; MERMET, 2006).

Os nebulizadores comumente empregados em ICP OES são os que operam de modo pneumático e ultrassônico. Em geral, a escolha do nebulizador depende do tipo de amostra a ser analisada, pois apenas as pequenas gotículas são transportadas para o plasma. Deste modo, a capacidade de produzir pequenas gotículas determina em grande parte na escolha do nebulizador. Os nebulizadores pneumáticos são os mais utilizados em ICP OES por apresentarem um diâmetro maior do capilar da amostra, quando comparado com os nebulizadores ultrasônicos e, portanto, são menos suscetíveis a entupimentos (BOSS; FREDEEN, 1999).

Neste trabalho foram utilizados os nebulizadores pneumáticos do tipo *cross-flow* e *conespray*. O funcionamento do nebulizador *cross-flow* ou de fluxo cruzado, consiste na passagem de um fluxo de gás argônio na direção perpendicular ao fluxo da amostra, cujo impacto produz o aerossol. Quando comparado ao nebulizador de vidro concêntrico, o *cross-flow* não é tão eficiente. Porém, o maior diâmetro do tubo capilar e maior distância entre os injetores (líquido e gasoso) minimizam os problemas de entupimento, sendo também mais robusto e resistente à corrosão. O nebulizador *conespray* é uma versão melhorada do nebulizador *V-Groove*. Este tipo de nebulizador é mais tolerante as soluções com altos teores de sólidos dissolvidos, sendo mais adequado para a maioria das amostras (BOSS; FREDEEN, 1999). Os esquemas dos nebulizadores *cross-flow* e *conespray* são apresentados na Figura 3.2.

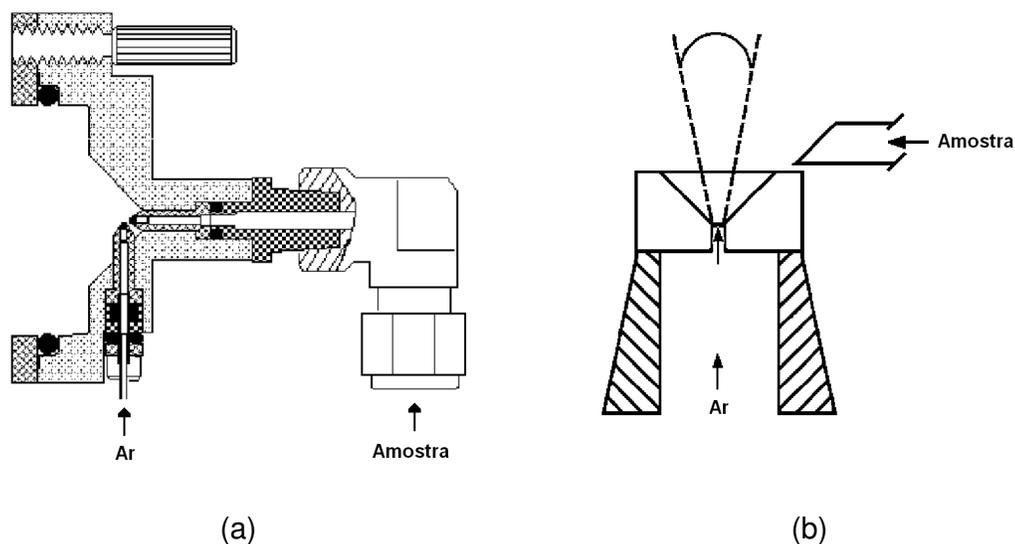


Figura 3.2: Esquema dos nebulizadores: (a) *cross-flow*; (b) *conespray* (BOSS; FREDEEN, 1999).

A câmara de nebulização é responsável pelo transporte e seleção das gotículas do aerossol, sendo as maiores descartadas e as menores, conduzidas ao plasma (GINÉ-ROSIAS, 1998). A presença de ácidos pode alterar esses processos, visto que são alteradas a viscosidade e a tensão superficial, podendo alterar também a intensidade do sinal de emissão (TODOLÍ; MERMET, 2006).

Neste trabalho foram empregadas as câmaras de nebulizações do tipo duplo-passo e ciclônica, cujos esquemas são apresentados na Figura 3.3. A câmara de nebulização duplo-passo tem um volume de 100 cm^3 , onde o aerossol formado no nebulizador passa por um tubo e, em seguida, é forçado a mudar sua trajetória em 180° ; nessa mudança de trajetória, apenas o aerossol terciário é transportado para o plasma. A câmara de nebulização ciclônica tem um volume interno de 40 cm^3 , sendo uma câmara de impacto, com relação ao comportamento de deposição de aerossol, ou seja, o aerossol primário é tangencialmente introduzido na câmara, em que uma fração do aerossol é perdida, devido os impactos nas paredes da câmara e as gotas restantes entram na saída superior da câmara, a qual está conectada com a tocha (BOSS; FREDEEN, 1999; TODOLÍ; MERMET, 2006).

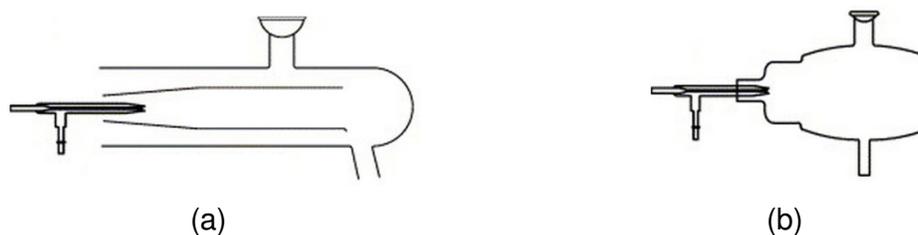


Figura 3.3: Esquema das câmaras de nebulização: (a) duplo-passo; (b) ciclônica (TODOLÍ; MERMET, 2006)

Existem dois modos de observação da tocha: radial e axial. Alguns equipamentos operam em apenas uma configuração (radial ou axial) e outros que combinam os dois modos (*double vision*). Na configuração radial da tocha, o sistema óptico capta as emissões que ocorrem no raio do plasma, sendo necessário o ajuste da altura de observação. Na configuração axial da tocha, o sistema óptico capta as emissões que ocorre ao longo do eixo longitudinal do plasma. Nos equipamentos que apresentam os dois modos de observação, a radiação emitida incide em lentes controladas por computador, mediante a escolha do modo de observação da tocha, cujo mecanismo de funcionamento é ilustrado na Figura 3.4. (BOSS; FREDEEN, 1999).

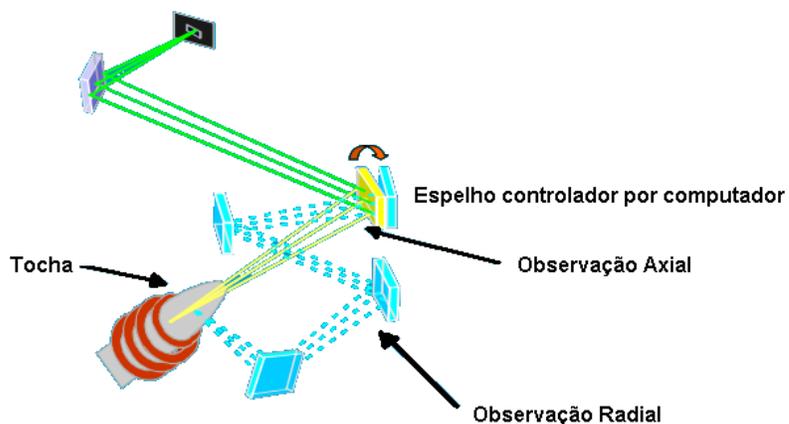


Figura 3.4: Mecanismo de observação da radiação emitida do plasma em instrumentos que permitem a dupla visão, axial e radial (BOSS; FREDEEN, 1999).

A Zona Analítica Normal (NAZ) é definida como a região de plasma onde as emissões são detectadas para as determinações espectrométricas. A NAZ é observada lateralmente na configuração radial, no entanto na configuração axial, a NAZ é prolongada, pois o canal inteiro do plasma é observado. Portanto a heterogeneidade espacial dos elementos tem menor influência na configuração axial, pois o campo de observação é maior (TREVIZAN; NÓBREGA, 2007).

Considerando que a região externa do plasma (cauda) tem menor densidade eletrônica e temperatura, em comparação com a região radial, é comum a utilização de um fluxo gasoso para remover a extremidade do plasma. O uso desse fluxo gasoso é fundamental para evitar efeitos de auto-absorção, proteger a interface óptica de dano térmico, prevenir a deposição de sais na entrada das lentes ópticas e espelhos, reduzir os efeitos de matriz e estender a faixa linear de calibração (BRENNER; ZANDER, 2000; TREVIZAN; NÓBREGA, 2007).

De modo geral, as determinações realizadas na configuração axial proporcionam melhores limites de detecção (LOD). Mas, é necessário avaliar a melhor configuração da tocha, de acordo com o tipo de amostra e com os elementos a serem determinados, sendo que essa avaliação deve ser realizada nas melhores condições de operação do plasma.

O termo "robustez" em ICP OES foi introduzido para indicar as condições em que o sinal de um analito, em uma dada concentração, não é significativamente afetado por mudanças na composição da matriz. Neste contexto, matriz consiste nas espécies químicas principais da amostra e os reagentes utilizados, tanto ácidos inorgânicos como solventes orgânicos (TOGNONI *et al.*, 2007).

A razão entre as intensidades de emissão do magnésio iônico a 280,2 nm e o magnésio atômico a 285,2 nm (Mg II/Mg I) vêm sendo utilizada para monitorar as condições do plasma. A literatura relata que o plasma se encontra em condições robustas quando essa razão for igual ou acima de 8. No plasma de argônio puro na razão Mg II/Mg I igual a 8 corresponde a uma temperatura de cerca de 5500 K, por isso que em condições robustas, o plasma é capaz de decompor a matriz independente da sua natureza e concentração (DENNAUD *et al.*, 2001; GROTTI *et al.*, 2008)

As espécies Mg (II) e Mg (I) são adotadas para avaliar a robustez do plasma uma vez que: (a) os dois comprimentos de onda são relativamente próximos, (b) as

intensidades das linhas iônicas e atômicas são da mesma magnitude, e (c) suas emissões podem ser quantificadas (DENNAUD *et al.*, 2001).

A razão entre as intensidades Mg II/Mg I pode ser usada para estudar os efeitos dos seguintes parâmetros: potência de rádio-frequência, vazão do gás de nebulização, configuração da tocha, eficiência dos micronebulizadores e o uso de solventes orgânicos. Essa razão também tem sido usada para estudar as interferências, pois um plasma operando em condições robustas não suprime totalmente os efeitos de matriz, mas esses efeitos não são mais provenientes do plasma (DENNAUD *et al.*, 2001). Condições robustas têm sido associadas à alta potência (1,4 kW), baixa vazão do gás de nebulização ($0,6 \text{ L min}^{-1}$) e um diâmetro interno do tubo do tubo injetor grande (2 mm) (TOGNONI *et al.*, 2007; GROTTI *et al.*, 2008).

3.3. Uso do Banho de Ultrassom

As ondas de ultrassom apresentam frequências superiores a 16 kHz e se propagam como onda mecânica por processo de ciclos sucessivos de compressão e expansão, através de qualquer meio material e não são sentidas pelo homem (KORN *et al.*, 2003; BARBOZA; SERRA; 1992).

As ondas do ultrassom, podem ser divididas em duas faixas: alta e baixa frequência. As ondas de alta frequência (maior que 2 MHz) são comumente usadas na medicina e engenharia para obtenção de imagens. As ondas de baixa frequência (20 e 100 kHz) apresentam maior potência e pode alterar o meio exposto à radiação por mudanças físicas e químicas (BARBOZA; SERRA, 1992; KRUG, 2008).

Quando líquidos são expostos as ondas de ultrassom, ocorre o processo de cavitação que é a formação, crescimento e colapso implosivo e rápido de microbolhas cheia de vapor. A rápida implosão das bolhas é devido as suas condições localizadas extremas de temperatura e pressão, estimadas em cerca de 5000 K e 0,1 GPa (KRUG, 2008; VIROT, 2010).

A cavitação é o processo que interessa a química analítica, visto que favorece a extração de espécies químicas ou a dissolução de amostras sólidas. (KORN, *et al.*, 2003). Entre as principais vantagens do uso do banho de ultrassom,

destacam-se: redução do tempo de reação, redução da quantidade de reagente, seletividade, favorecimento de reações que não ocorrem em condições normais e simplificação de alguns sistemas reacionais (redução de custos) (BARBOZA; SERRA, 1992). Entretanto, é necessário um rigoroso controle das condições experimentais

Neste sentido, Nascentes *et al.* (2001) propôs algumas condições de otimização do ultrassom (Neytech e Cole-Parmer) para a obtenção de máxima intensidade de cavitação, as quais foram: o uso de uma solução aquosa a 0,2 % (v/v) de detergente à temperatura ambiente; posicionamento central e ao fundo para os tubos contendo as amostras, em que devem ser processados somente um tubo por vez por um período de até 10 minutos com a substituição da solução de detergente, após o processamento de até 6 amostras consecutivas.

Batista *et al.* (2011) propuseram um método para especiação de Hg em amostras de frutos do mar, em que a parte comestível foi moída, homogeneizada e liofilizada. Aproximadamente, 0,2 g da amostra foi misturada em 10 mL de uma solução contendo 0,10 % (v/v) de HCl, 0,05 % (m/v) de L-cisteína e 0,10 % (v/v) de 2-mercaptoetanol e sonicada por 15 min. As frações do Hg foram separadas por cromatografia líquida de fase reversa e analisadas por ICP-MS. O método foi validado utilizando amostras certificadas (CRMs DOLT-3 e DORM-3), apresentando uma boa concordância com os valores declarados. Os autores aplicaram o método em 19 amostras de frutos do mar (peixe, atum, mexilhão, polvo, camarão e lula), e verificaram que o metilmercúrio é a espécie predominante em todas as amostras.

Padilha *et al.* (2011) desenvolveram um método para determinar Cu, Mg e Se em hortaliças (folhas de abóbora, beterraba, cenoura e couve) através da extração dos analitos por sonicação e posterior quantificação em ETAAS. As amostras foram desidratadas a 50 °C em estufa de circulação forçada até peso constante e trituradas até granulométrica inferior a 60 µm. Foram misturados 100 mg de amostra em 10 mL de HCl a 0,10 mol L⁻¹ e sonicadas, sendo avaliado o tempo e a potência do banho. O sobrenadante foi analisado, após centrifugação a 13.000 rpm. Os autores verificaram que após 5 ciclos de 40 s (3,33 min) na potência de 136 W, o sinal do ETAAS permaneceu praticamente constante. Os resultados foram comparados com os resultados obtidos através da mineralização das amostras em forno de microondas, os quais foram estatisticamente similares. Portanto, os autores

concluíram que o método proposto é equivalente ao método de mineralização em forno de microondas, apresentando menor consumo de reagente e menor o tempo de análise.

Santos *et al.* (2010) avaliaram o efeito do banho de ultrassom e da centrifugação na extração de Ca, Cd, Cu, K, Mn, Na, Mg, Sr e Zn, por ICP OES em amostras de ostras, moluscos e mexilhões, coletadas na Baía de Todos os Santos, na Bahia. A otimização do método foi feita utilizando tecido de ostra certificada (NIST 1556b). O procedimento consistiu em misturar 0,25 g de amostra em 10 mL de uma solução contendo HCl, HNO₃ e H₄C₂O₂ a 1,0 mol L⁻¹, seguido por uma sonicação por 15 min e centrifugação a 9000 rpm por 15 min. Os autores observaram que o efeito da sonicação antes da centrifugação foi muito variável, mas promoveu um aumento significativo das extrações (12 a 44 %) para alguns elementos essenciais. Além disso, a combinação sonicação/centrifugação ofereceu uma melhor precisão e exatidão. Os resultados mostraram as concentrações de Cd e Cu nas amostras de ostras e Zn nas amostras de mexilhões e moluscos acima das recomendações para o consumo, sugerindo que sua ingestão pode impor riscos à saúde.

Pontes *et al.* (2010) desenvolveram um método para determinar Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Ti, V e Zn em cinzas de carvão por ICP OES. O procedimento consistiu na sonicação por 30 min da mistura de 0,4 g da amostra desidratada com 10 mL de água régia e 2 mL de HF. A mistura foi centrifugada a 3200 rpm e o sobrenadante transferido para um frasco de teflon. Ao resíduo foram adicionados 5 mL de HNO₃ a 10 % (v/v), homogeneizado e misturado com o sobrenadante. A mistura foi secada em chapa de aquecimento por 1 hora, seguida pela adição de 5 mL de HNO₃ e avolumada para 50 mL. O tempo da sonicação foi avaliado para cada elemento. Para Co, Fe, Mn, Ti e V, 10 min de sonicação foi suficiente para obter recuperações na faixa de 90 a 110 %, para o Cu e Zn foram necessários 30 min e para o Cr, 30 a 240 min foram obtidas recuperações entre 85 e 89 %. Os autores também avaliaram o efeito da agitação manual entre as digestões e verificaram que não existe diferença significativa entre a agitação e a ausência da mesma.

3.4 Disponibilidade dos Constituintes Inorgânicos

A composição dos alimentos é uma indicação do seu valor nutritivo, no entanto, não é suficiente para uma caracterização completa, sob o ponto de vista nutritivo, porque são raros os nutrientes que se tornam totalmente disponíveis após a ingestão. A porção disponível é aquela que está em uma forma que pode ser absorvida pelo organismo, enquanto a porção biodisponível de qualquer nutriente é aquela que é absorvida pelo organismo em seu metabolismo celular (SGARBIERI, 1987).

Uma maior atenção tem sido dada à composição qualitativa e quantitativa (análise) de proteínas, lipídios, carboidratos e vitaminas, enquanto que para elementos essenciais, apenas os valores de referência diários de ingestão de nutrientes são considerados (SLATER, MARCHIONI, FISBERG, 2004).

A importância da determinação da disponibilidade de elementos minerais em dietas está centralizada no estabelecimento das recomendações de ingestão desses elementos em função das necessidades dos indivíduos. Assim, os estudos da disponibilidade de nutrientes devem ser específicos para cada país, tendo em vista a grande diversidade de dietas e de indivíduos (COZZOLINO, 2007).

Perales *et al.* (2005) avaliaram a eficiência do transporte e da absorção pelas células Caco-2 em alimento infantil (fórmulas infantis a base de leite e sucos de frutas com leite e cereais), com base na digestão *in vitro*, solubilidade do cálcio e os valores da diálise. Após a quantificação por FAAS, os autores concluíram que a classificação das amostras de acordo com a biodisponibilidade de cálcio depende do critério utilizado (solubilidade ou dialisabilidade). Para a solubilidade, os valores mais elevados corresponderam às fórmulas a base de leite e os menores, para os sucos de frutas. No entanto, ao se utilizar a diálise, foi observado o contrário, os valores percentuais mais elevados corresponderam aos sucos de frutas e os menores para as fórmulas a base de leite. Isto é, as maiores percentagens em transporte e absorção pelas células Caco-2 foram observadas para os sucos de frutas, seguido pelas fórmulas lácteas. Os ensaios com as células Caco-2 ofereceram uma estimativa do processo de absorção e podem ser considerados como um indicador melhor do que a solubilidade para a determinação da biodisponibilidade do cálcio.

Laparra *et al.* (2005) estudaram as concentrações do arsênio total (AsT) e arsênio inorgânico (AsI) no arroz cozido com água contaminada por As, verificando a retenção e o transporte de arsênio por células Caco-2. Os autores observaram que, após o cozimento, ocorreu um aumento significativo no teor de AsI e que, após a digestão *in vitro*, a sua biodisponibilidade se mostrou entre 63 a 99 %, sendo o As (V) a principal espécie encontrada. Em células Caco-2, a retenção do arsênio foi entre 0,6 e 6,4 %, o transporte entre 3,3 a 11,4 % e a absorção total (retenção somado ao transporte) variou entre 3,9 a 17,8 %. Neste caso, o arroz cozido com água contaminada por arsênio apresenta níveis elevados de As.

Remondetto, Beyassac e Subirade (2004) verificaram a influência da microestrutura hidrogel (filamentos e partículas) das proteínas do soro de leite na liberação de ferro em diferentes condições, inclusive condições simuladas do trato gastrointestinal. Os experimentos foram inicialmente conduzidos para determinar o impacto do pH sobre as proteínas na liberação do ferro. Os autores concluíram que as proteínas na forma de partículas liberam mais ferro do que na forma de filamentos em meio ácido. Na presença de pepsina em pH 1,2 ou pancreatina em pH 7,5, as microestruturas dos dois tipos de proteínas mostraram aumento por hidrólise, mas apenas as filamentosas apresentaram um aumento da liberação de ferro, sugerindo que a estrutura da matriz desempenha um papel importante no fornecimento de ferro. Testes de biodisponibilidade foram realizados simulando a digestão gastrointestinal para imitar o processo de dissolução *in vivo*, sendo observado que as proteínas filamentosas liberam mais ferro durante a digestão intestinal, portanto, o ferro é protegido durante a digestão gástrica. A absorção de ferro pelas células Caco-2, utilizadas para estimar a absorção intestinal, revelou que as proteínas filamentosas favoreceram a absorção do ferro intracelular e, segundo os autores, deveria ser de interesse principal o desenvolvimento de novos alimentos funcionais.

Laparra *et al.* (2003) determinaram a bioacessibilidade (máxima concentração solúvel em meio gastrointestinal) do conteúdo de AsT e AsI, presentes em algas comestíveis cozidas, utilizando a técnica de espectrometria de absorção atômica com geração de hidreto (HG-AAS). Uma mistura para digestão gastrointestinal *in vitro*, constituída por pepsina em pH 2 e extrato de pancreatina-bile em pH 7, foi feita para obtenção da fração mineral solúvel em três algas: *Hizikia*

fusiforme, *Porphyra* sp. e *Enteromorpha* sp. O AsT foi determinado após calcinação e o AsI, após digestão ácida e extração com solventes. A bioacessibilidade do AsI aumentou significativamente após o cozimento, alcançando 73 % em *Porphyra* sp. e 88 % em *H. fusiforme*, cuja concentração biodisponível foi de 26 $\mu\text{g g}^{-1}$; indicando o risco tóxico deste alimento.

Glahn *et al.* (1998) adaptaram o método de digestão *in vivo* com as células Caco-2, para a formação de ferritina e, assim, avaliar a sua disponibilidade nos alimentos. O objetivo dos autores foi verificar se a formação de ferritina era proporcional à absorção de Fe e se o método proposto era suficientemente sensível para ser um indicador da disponibilidade do Fe digerido nos alimentos. Os autores observaram que houve uma maior formação de ferritina nas células expostas ao digerido contendo ácido ascórbico (um forte potenciador de absorção do ferro disponível) do que no digerido contendo ácido cítrico. Comparações complementares em digeridos de carne, peixe, milho e feijão verde demonstram uma maior disponibilidade de Fe nas amostras de carne e peixe do que no digerido a partir de milho e feijão verde. Portanto, a utilização de células Caco-2 para a formação de ferritina se mostrou como um marcador altamente sensível para a captação de Fe, permitindo a determinação da sua biodisponibilidade a partir das digestões *in vitro*. O baixo custo, facilidade de uso e aceitação generalizada das células Caco-2 tornam o modelo uma alternativa atraente para estudos com animais e uma ferramenta valiosa para uso em conjunto com testes em humanos.

Mais e mais interesse tem sido dado à função dos elementos na nutrição humana, pois a constituintes inorgânicos dos alimentos desempenham importantes funções biológicas. No entanto, o comportamento biológico (disponibilidade/biodisponibilidade e toxicidade) de um determinado elemento depende fortemente da forma química em que ocorrem em sistemas biológicos. Por isso, estudos de disponibilidade são necessários, a fim de obter mais informações sobre os nutrientes inorgânicos em soro de leite bovino para fins nutricionais.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Materiais e Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau de pureza analítica e a água desionizada utilizada foi produzida por um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA), apresentando condutividade de 18 M Ω cm. O argônio (White Martins, SP, BR) empregado para as análises foi de pureza 99,996 %.

Todos os materiais utilizados, frascos de polietileno e vidrarias, foram previamente deixados em banho de HNO₃ 10 % (v/v) por 24 horas, enxaguados e secos.

As soluções-padrão utilizadas para quantificar os elementos foram obtidas de suas respectivas soluções estoque (1000 mg L⁻¹ para: Co, Cu, Mo, Mn, Zn, Fe e Y e 4000 mg L⁻¹ para: Na, Ca, K e Mg) preparadas em meio de HNO₃ a 1 % (v/v).

4.2 Instrumentação

Para o procedimento de pré-tratamento das amostras, foram utilizados os seguintes equipamentos: banho-maria, Quimis, modelo Q226M1; banho de ultrassom, Uniqui, modelo USC 1400; chapa de aquecimento, Pemem, modelo PAM-18; centrífuga, Quimis, modelo Q222T204.

Para a quantificação do teor de carbono orgânico total (TOC) em amostra de soro de leite foi empregado o equipamento Total TOC-5000, Shimadzu (TK, JP).

Para a determinação simultânea dos elementos metálicos foi utilizado um espectrômetro de emissão óptica em plasma indutivamente acoplado (ICP OES, Perkin Elmer, Optima 3000DV, Norwalk, CT, USA). As condições de operação são apresentadas na Tabela 4.1.

Os comprimentos de onda usados neste trabalho para os micro-constituintes Co, Cu, Mo, Mn, Zn e Fe e para os macro-constituintes Na, Ca, K e Mg são mostrados na Tabela 4.2.

Tabela 4.1: Condições de operação do ICP OES.

Parâmetros	Condições
Potência aplicada (kW)	1,1-1,5
Vazão do argônio (L min ⁻¹)	Auxiliar: 0,5 Principal: 15 Nebulização: 0,3 – 1,0
Vazão do bombeamento (mL min ⁻¹)	1,0 ou 1,5
Altura da visão radial (mm)	15
Diâmetro do tubo injetor (mm)	2
Tempo de integração (s)	5
Tempo de leitura (s)	30

Tabela 4.2: Linhas espectrais e comprimentos de onda utilizados para as determinações das espécies metálicas.

Elementos	Linha espectral	λ (nm)
Co	II	228,6
Mo	II	202,0
Mn	II	257,6
Cu	I	324,7
Fe	II	238,2
Zn	II	213,9
Mg	I	285,2
Mg	II	280,2
Na	I	330,2
Ca	I	317,9
K	I	766,5
Y*	II	371,0
C	I	193,0

I: corresponde a linha atômica; II: corresponde a linha iônica;

* Padrão interno

4.3 Amostras Estudadas

As amostras de soro de leite estudadas foram previamente preparadas por coagulação enzimática e por coagulação ácida a partir de leites fluidos, integral e desnatado, adquiridos no comércio, para as quais são dadas as seguintes denominações:

- Soro de leite integral, obtido por coagulação enzimática (CEI, CEI₂);
- Soro de leite integral, obtido por coagulação ácida (CAI);
- Soro de leite desnatado, obtido por coagulação enzimática (CED);
- Soro de leite desnatado, obtido por coagulação ácida (CED).

4.4 Preparo das Amostras de Soro de Leite

4.4.1 Coagulação Enzimática

Aproximadamente 1 L de leite foi colocado em banho-maria e a variação da sua temperatura foi monitorada até atingir 35 ± 3 °C. A seguir, iniciou-se o procedimento de coagulação pela adição de 1,00 mL de cultura mesófila (iogurte natural), para obter uma concentração de 1 % da cultura na solução resultante. Foram também adicionados ao leite aquecido 62 mL de CaCl₂ a 4000 mg L⁻¹, obtendo-se uma concentração final de aproximadamente 250 mg L⁻¹ de CaCl₂. A solução resultante foi agitada levemente, adicionando-se em seguida 1,00 mL de coalho (marca Estrela), volume necessário para coagular 1 L de leite. A quantidade do coalho necessária varia de acordo com sua capacidade de coalhar o leite, que pode variar de fabricante para fabricante. Após agitação, o leite coagulado foi deixado em repouso por 24 horas (ROMAN; SGARBIERI, 2005).

Finalizada a etapa de coagulação, o coagulado foi cortado em cubos e agitado levemente para que ocorresse o desprendimento de seu soro. Em seguida, a parte coagulada foi retirada e colocada em uma peneira comum para separação do seu soro. O soro de leite obtido foi armazenado em frascos de polietileno e acondicionado sob refrigeração a 5 ± 3 °C.

4.4.2 Coagulação Ácida

Para a coagulação ácida, aproximadamente 1 L de leite foi aquecido em banho-maria a 80 ± 2 °C, quando foram adicionados 3,50 mL de ácido láctico a 85 % (v/v), sob vigorosa agitação, verificando-se a sua coagulação. O leite coagulado foi deixado em repouso por aproximadamente 24 horas (CUNHA *et al.*, 2002). Após este período, o coagulado foi cortado em cubos e agitado levemente para que ocorresse o desprendimento do soro. Em seguida, a mistura foi colocada em uma peneira comum para separação do soro residual. O soro de leite obtido foi armazenado em frascos de polietileno e acondicionado sob refrigeração a 5 ± 3 °C.

4.5 Tratamento das Amostras de Soro de Leite

No desenvolvimento dos métodos apresentados a seguir, foi utilizada à amostra soro de leite CEI. Para as determinações dos macro-constituintes Na, Ca, K, e Mg, a amostra foi diluída a 30 % (v/v), devido ao alto teor desses elementos na matriz.

4.5.1 Digestão Ácida em Chapa de Aquecimento (CH)

O procedimento consistiu em quatro etapas, descritas a seguir, empregando-se a digestão ácida em chapa de aquecimento, devido ao alto teor de matéria orgânica presente na amostra.

1^a etapa: 25,00 mL de soro de leite foram aquecidos a uma temperatura de 80 °C, durante duas horas para a redução do seu volume em aproximadamente 20 %, seguido pelo seu resfriamento à temperatura ambiente;

2^a etapa: foram adicionados 20,00 mL de HNO₃ a 65 % (v/v), mantendo-se o aquecimento a 80 °C por quatro horas. A mistura resultante foi resfriada à temperatura ambiente, verificando-se visualmente que não estava totalmente digerida, devido a uma grande quantidade de material particulado em suspensão;

3^a etapa: foram adicionados 3,0 mL de HNO₃ a 65 % (v/v) e 3,0 mL de H₂O₂ a 30 % (v/v), mantendo o aquecimento a 80 °C por duas horas. Após o resfriamento, a

temperatura ambiente, observou-se visualmente que ainda havia uma quantidade razoável de material particulado em suspensão;

4ª etapa: foram adicionados 2,0 mL de HNO₃ a 65 % (v/v) e 2,0 mL de H₂O₂ a 30 % (v/v), submetendo-se a mistura ao aquecimento a 80 °C por mais uma hora, verificando-se que após os sucessivos ataques ácidos a amostra se apresentava completamente límpida. Assim, o digerido obtido foi diluído para 25,00 mL com água desionizada, apresentando um pH na faixa de 5 a 6,5.

O tempo total da digestão ácida em chapa de aquecimento foi de nove horas. As digestões foram conduzidas de forma branda para evitar o superaquecimento das soluções e, conseqüentemente, perdas de amostras por projeção. Os frascos foram cobertos com vidro de relógio para manter o refluxo e evitar a contaminação das soluções.

A avaliação da exatidão dos resultados foi realizada por experimentos de adição e recuperação de analitos em dois níveis de concentrações.

4.5.2 Introdução Direta (ID)

A quantificação dos elementos foi feita pelo método via introdução direta de amostras de soro de leite por ICP OES contra uma curva analítica em meio aquoso para os elementos estudados.

Os efeitos de interferência de matriz foram avaliados por comparação entre as sensibilidades obtidas por curvas analíticas em meio aquoso e por curvas de adição de analitos e a avaliação da exatidão por experimentos de adição e recuperação de analitos em dois níveis de concentrações.

4.5.3 Uso do Banho de Ultrassom (US)

A técnica do ultrassom foi empregada com o objetivo de favorecer a extração dos analitos de interesse nas amostras de soro de leite. Para isto, as amostras foram submetidas a um banho ultrasônico durante cinco minutos, em que os recipientes contendo a amostra foram colocadas uma a uma no centro da cuba do instrumento, para permitir a intensidade máxima de cavitação, como sugerido por

Nascentes *et al.* (2001). Em seguida, os elementos foram determinados por ICP OES.

Os efeitos de interferência de matriz, assim como no item anterior, foram avaliados através da comparação entre as sensibilidades obtidas por curvas analíticas em meio aquoso e por curvas de adição de analitos e a avaliação da exatidão por experimentos de adição e recuperação de analitos em dois níveis de concentrações.

Como aplicação do método, foram estudadas outras amostras de soro de leite obtidas por coagulação enzimática e ácida (CEI₂, CAI, CED e CAD).

4.6 Otimização Instrumental

4.6.1 Otimização das Condições Robustas

Nesse estudo, utilizou-se o soro de leite não mineralizado, obtido pela coagulação enzimática do leite integral (CEI). Deste modo, a otimização instrumental foi feita usando o método ID, cujas condições instrumentais foram empregadas nos métodos CH e US.

Não foi adicionada solução de Mg a amostra, uma vez que esta contém elevado teor de Mg em sua composição. Sendo assim, as intensidades determinadas para o Mg foram as provenientes da própria matriz em estudo.

As condições robustas foram determinadas observando o efeito sobre a razão entre as intensidades do Mg II/Mg I quando variada, em ordem, a vazão de nebulização, a potência da rádio-frequência e a vazão do gás auxiliar para cada um dos sistemas de nebulização estudados (CF-DP e CS-CC), em ambas as configurações da tocha.

O procedimento consistiu em determinar a melhor vazão do gás de nebulização, fixando-se a potência de rádio-frequência em 1,3 kW e variando a vazão do gás de nebulização na faixa de 0,3 a 1,0 L min⁻¹. Na vazão do gás de nebulização otimizada, foi determinada a melhor potência da rádio-frequência por sua variação no intervalo de 1,1 a 1,5 kW. Com a vazão do gás de nebulização e

potência da rádio-frequência otimizadas, foi determinada a melhor vazão do gás auxiliar por sua variação no intervalo de 0,2 a 1,0 L min⁻¹.

4.6.2 Escolha dos Sistemas de Nebulização

A escolha do sistema de nebulização, CF-DP ou CS-CC, a ser empregado foi feita mediante pela comparação entre as sensibilidades obtidas por curvas de adição de analito para cada elemento estudado, utilizando a amostra CEI não mineralizada e empregando os métodos CH e US.

4.7 Estudos da Disponibilidade dos Constituintes Inorgânicos em Soro de Leite

O procedimento utilizado para a determinação dos elementos disponíveis foi feito de acordo com a metodologia descrita por Glahn *et al.* (1998) que simula *in vitro* o processo de digestão em duas etapas seqüenciais: digestão ácida, para simular a digestão gástrica; digestão em pH alcalino, para simular a digestão intestinal (no trato gastrintestinal).

Para a simulação da digestão gástrica, uma solução de pepsina foi preparada pela mistura de 0,20 g de pepsina em 8,0 mL de solução de HCl a 0,1 mol L⁻¹, seguido por e agitação até completa dissolução da pepsina.

Para a simulação da digestão intestinal, uma solução foi preparada pela mistura de 0,05 g de pancreatina e 0,30 g de extrato de bile e 25,00 mL de NaHCO₃ a 0,1 mol L⁻¹ e agitada até completa dissolução.

Foram empregados 10,00 mL de cada amostra de soro de leite (CEI, CAI, CED, CAD). Inicialmente, na etapa de digestão gástrica, o pH das amostras foi ajustado para próximo a 2 pela adição de HCl a 5,0 mol L⁻¹. Em seguida, acrescentou-se 0,50 mL da solução de pepsina (0,0125 g de pepsina por mL da amostra). As misturas foram então colocadas em banho-maria, a uma temperatura de 37 ± 3 °C, durante 60 minutos, sob agitação constante.

Em seguida, a mistura foi submetida ao processo de simulação da digestão intestinal, em que o pH do digerido gástrico foi ajustado para aproximadamente 6

pela adição de NaHCO_3 $1,00 \text{ mol L}^{-1}$. Em seguida, foram adicionados 2,50 mL da solução de extrato de bile-pancreatina (0,005 g de pancreatina e 0,03 g de bile/mL da amostra) e submetidos ao aquecimento em banho-maria a $37 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ por 2 horas, sob agitação constante. O digerido obtido foi submetido a um banho de gelo por 10 minutos para cessar a ação enzimática. O pH foi ajustado para aproximadamente 7,2 com a adição de solução de NaOH $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e centrifugado a 3500 rpm por 30 minutos, a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Ao término da centrifugação a parte solúvel foi separada do precipitado e seus os elementos, considerados disponíveis, foram determinados por ICP OES.

4.8 Figuras de Mérito

Sensibilidade da calibração é também conhecida como a inclinação da curva analítica ou coeficiente angular da curva analítica. Sua determinação foi feita pela média de 3 determinações, através da expressão (1), onde m é o coeficiente angular da curva analítica, Δ_y é a variação da resposta e Δ_x é a variação da concentração (SKOOG *et al.*, 2007).

$$m = \frac{\Delta_y}{\Delta_x} \quad (1)$$

A concentração equivalente de fundo (BEC) é, geralmente, definida como a concentração que produz um sinal equivalente a intensidade do sinal do branco, portanto fornece uma estimativa da quantidade de radiação de fundo. Sua determinação foi feita a partir da curva analítica (intensidade *versus* concentração), isto é através da expressão (2), dada a seguir, em que I_b corresponde à intensidade média de 11 determinações do sinal do branco (THOMSEN, ROBERTS, BURGESS, 2000).

$$BEC = \frac{I_b}{m} \quad (2)$$

O limite de detecção (LOD) é a menor concentração do analito, em que podemos distinguir o sinal do analito do sinal do fundo, ou seja, a menor quantidade

de analito que é “significativamente” diferente do branco. Sua determinação foi feita através da expressão (3), dada a seguir. Nessa expressão o RSD_b corresponde ao desvio padrão relativo ao branco ($n = 11$) (THOMSEN, ROBERTS, BURGESS, 2000).

$$LOD = \frac{3 \times RSD_b \times BEC}{100} \quad (3)$$

O limite de quantificação (LOQ) é a menor concentração do analito que pode ser determinada com exatidão, sob as condições experimentais estabelecidas. Sua determinação foi feita através da expressão (4), dada a seguir (THOMSEN, SCHATZLEIN, MERCURO; 2003).

$$LOQ = 3,3 LOD \quad (4)$$

As determinações das concentrações dos elementos estudados nas amostras foram feitas em triplicatas e nas condições robustas determinadas, utilizando o sistema de nebulização que apresentou as melhores respostas analíticas.

Na ausência de material de referência certificado para o soro de leite, a avaliação da exatidão para cada método foi feita através de experimentos de adição e recuperação dos analitos nas amostras em dois níveis de concentração. As concentrações adicionadas foram: 1,0 e 5,0 mg L⁻¹ para Co, Mo, Mn, Cu, Fe e Zn e 25,0 e 80,0 mg L⁻¹ para Mg, Na, Ca e K.

4.9 Comparação Entre os Resultados

Com o objetivo de verificar a existência de diferenças significativas entre os resultados obtidos pelos métodos ID e US com o método CH, utilizado como referência, foram aplicados os testes estatísticos **F** e **t** (a 95 % de confiança) para comparar as precisões e os valores das concentrações médias, de acordo com as expressões (5) e (6), em que S_1^2 e S_2^2 são as variâncias, \bar{x}_1 e \bar{x}_2 são as

concentrações médias e n_1 e n_2 o número de determinações dos métodos 1 e 2, respectivamente (SKOOG *et al.*, 2007).

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2} \quad (5)$$

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}} \quad (6)$$

Para avaliar as diferenças menos significativas (DMS) entre as concentrações dos analitos em diferentes amostras, obtidas por US, foi empregado o teste estatístico Análise de Variância (ANOVA, com 95 % de confiança), de acordo com Skoog *et al.* (2007).

4.10 Tratamento dos Resíduos

Os resíduos das amostras enriquecidas e das soluções-padrões foram estocados em galões de polipropileno para que fossem tratados e descartados.

Ao término do trabalho os resíduos aquosos foram tratados por precipitação fracionada em pH controlado com o uso de NaOH a $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (Committee on Hazardous Substances in the Laboratory, 1983). Os precipitados foram separados da fase aquosa, empregando papel de filtro qualitativo. Os resíduos sólidos obtidos foram mantidos nos papéis de filtro utilizados, acondicionados em sacos plásticos, rotulados e enviados para o depósito de resíduos do Instituto de Química da UNICAMP.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Otimização Instrumental

5.1.1 Condições Robustas

Na Figura 5.1 são mostrados os efeitos da variação da vazão do gás de nebulização sobre a razão Mg II/Mg I quando fixada a potência da rádio-freqüência em 1,3 kW, usando os sistemas de nebulização CS-CC e CF-CD, as configurações axial e radial e a amostra CEI não mineralizada.

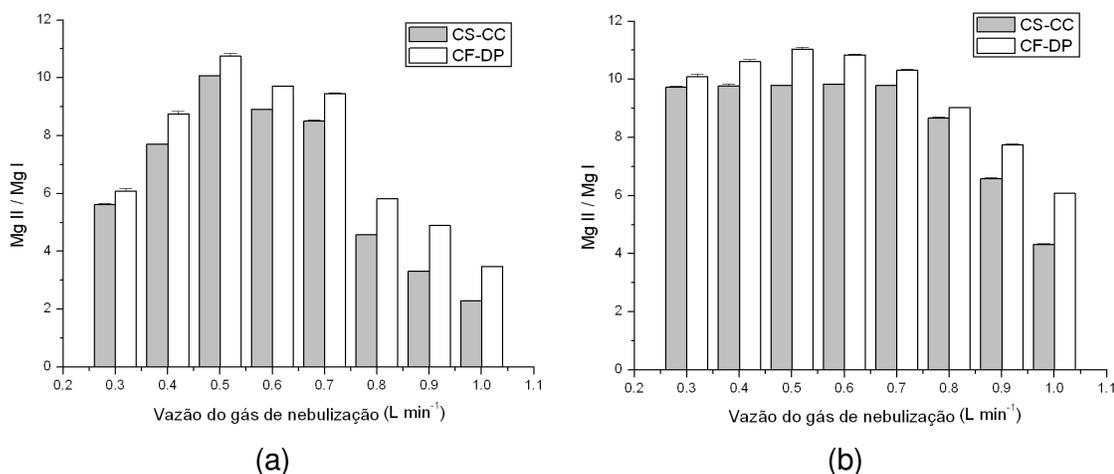


Figura 5.1: Efeito da variação da vazão do gás de nebulização sobre a razão Mg II/Mg I na potência da rádio-freqüência de 1,3 kW nos sistemas CF-DP e CS-CC: (a) configuração axial, (b) configuração radial.

Em ambas as configurações estudadas foram verificadas que o emprego do sistema CS-CC resultou em RSDs próximos de 0,6 %, os quais foram numericamente menores quando comparados com o sistema CF-DP que se mostraram próximos a 3,2 %. Os valores baixos de RSDs obtidos para o sistema CS-CC se devem ao fato de que este sistema foi desenvolvido para suportar soluções com valores elevados em viscosidade e em sólidos dissolvidos com menores riscos de entupimento (MAESTRE, MORA; TODOLÍ, 2002).

Observa-se na Figura 5.1a que são obtidos valores acima de 8 para as razões Mg II/Mg I na configuração axial, utilizando vazões do gás de nebulização na faixa de 0,4 a 0,7 L min⁻¹. Enquanto que para o sistema CS-CC, as vazões do gás de nebulização estão entre 0,5 a 0,7 L min⁻¹.

Na Figura 5.1b é verificado que na configuração radial as razões Mg II/Mg I para os dois sistemas de nebulização investigados foram praticamente constantes quando em vazões inferiores a 0,7 L min⁻¹. Por outro lado, para vazões do gás de nebulização superiores a 0,7 L min⁻¹, ocorre uma diminuição das razões Mg II/Mg I nos dois sistemas (CF-DP variou de 9,0 a 6,1 e CS-CC variou de 8,7 a 4,3). Isso se deve, provavelmente, ao fato da diminuição do tempo de residência do analito no plasma.

O maior valor para a razão Mg II/Mg I obtida na configuração radial foi de 11,0 para o sistema CF-DP e de 9,8 para o sistema CS-CC, sendo esses valores próximos àqueles observados na configuração axial, isto é, de 10,8 para o sistema CF-DP e de 10,1 para sistema CS-CC, quando empregadas as vazões do gás de nebulização de 0,6 L min⁻¹ para o sistema CF-DP e de 0,7 L min⁻¹ para o sistema CS-CC.

Para o sistema CF-DP em ambas as configurações a maior razão Mg II/Mg I foi obtida na vazão do gás de nebulização a 0,5 L min⁻¹. Entretanto, quando utilizado esse valor de vazão foram observados problemas físicos como o entupimento do sistema de nebulização e do tubo injetor, não sendo prático trabalhar em rotina nesta condição. Assim, optou-se por utilizar a vazão do gás de nebulização a 0,6 L min⁻¹, na qual não foram observados problemas físicos e nesta condição, o plasma continua operando em condições robustas.

Com as vazões do gás de nebulização otimizadas para os dois sistemas de nebulização estudados, foi avaliado o efeito da variação potência da rádio-frequência no intervalo de 1,1 a 1,5 kW sobre a razão Mg II/Mg I, nas configurações axial e radial, cujos resultados são apresentados na Figura 5.2.

Através da Figura 5.2, observa-se que as razões Mg II/Mg I variaram muito pouco na faixa de 1,1 a 1,5 kW, em ambas configurações para os dois sistemas de nebulização utilizados, mostrando que o plasma apresenta uma boa transferência de energia para a amostra nestas condições (BRENNER; ZANDER, 2000).

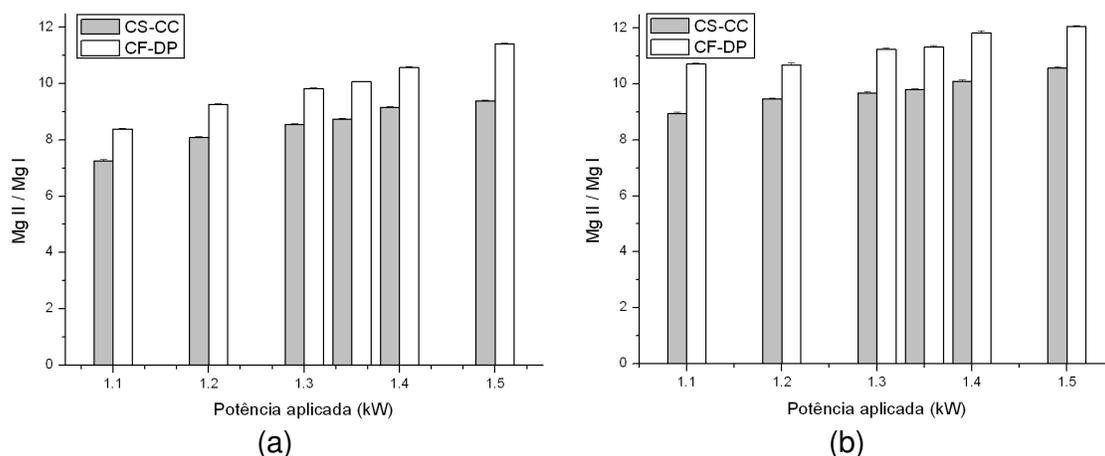


Figura 5.2: Efeito da variação da potência da rádio-frequência sobre a razão Mg II/Mg I, utilizando vazão do gás de nebulização a $0,6 \text{ L min}^{-1}$ e $0,7 \text{ L min}^{-1}$ nos sistemas CF-DP e CS-CC, respectivamente: (a) configuração axial, (b) configuração radial.

Utilizando a potência de 1,35 kW, nas vazões do gás de nebulização estabelecidas, os valores obtidos das razões Mg II/Mg I na configuração axial, para os dois sistemas estudados, não se mostraram muito diferentes. Isto é, nestas condições, utilizando o sistema CF-DP a razão Mg II/Mg I é de 10,1 e para o sistema CS-CC de 8,7. Enquanto que para a configuração radial, os valores das razões Mg II/MgI foram de 11,8 para o sistema CF-DP e de 10,1 para o sistema CS-CC. Assim, para ambas as configurações da tocha e nos dois sistemas de nebulização o plasma opera em condições robustas na potência da rádio-frequência em 1,35 kW.

Com as vazões do gás de nebulização e da potência da rádio-frequência otimizadas para os dois sistemas de nebulização estudados, foi avaliado o efeito da vazão do gás auxiliar no intervalo de $0,2$ a $1,0 \text{ L min}^{-1}$ sobre a razão Mg II/Mg I, cujos resultados são apresentados na Figura 5.3.

Através da Figura 5.3, pode-se observar que as razões Mg II/Mg I permanecem praticamente constantes com o aumento da vazão do gás auxiliar, para ambas as configurações nos dois sistemas de nebulização estudados. Na configuração axial, as razões Mg II/Mg I se mostram próximas a 9,8 para o sistema CF-DP e para o sistema CS-CC, próximas a 8,7. Por outro lado, na configuração

radial as razões Mg II/Mg I ficaram próximas a 10,7 para o sistema CF-DP e para o sistema CS-CC próximas a 9,8.

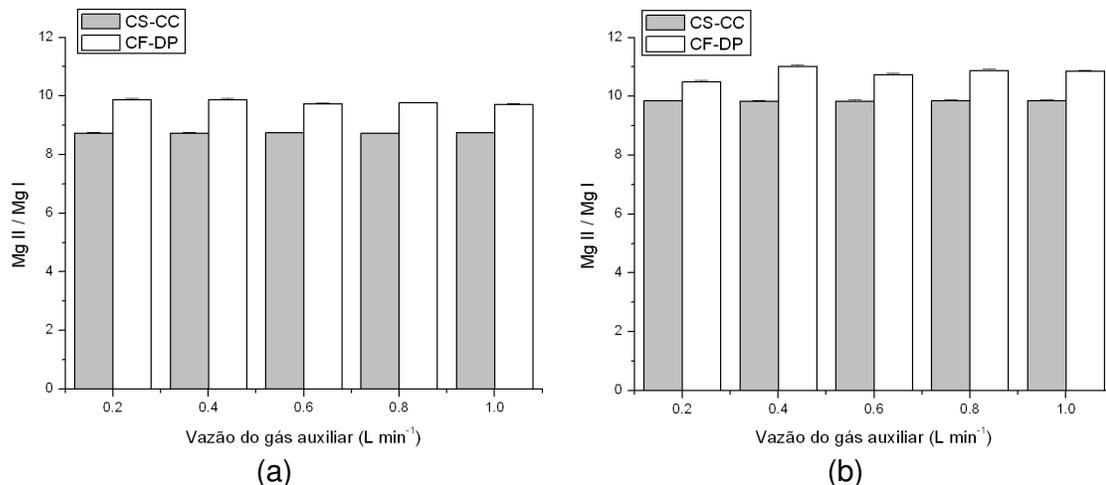


Figura 5.3: Efeito da variação vazão do gás auxiliar sobre as razões Mg II/Mg I usando a potência da rádio-frequência em 1,35 kW e as vazões do gás de nebulização em 0,6 L min⁻¹ e 0,7 L min⁻¹ para os sistemas CF-DP e CS-CC, respectivamente: (a) configuração axial, (b) configuração radial.

Assim, pôde-se verificar que a variação da vazão do gás auxiliar pouco afeta a razão Mg II/MgI. Isto indica que, provavelmente, a temperatura do plasma não é alterada com a variação da vazão do gás auxiliar nas condições observadas.

Portanto, para ambas as configurações o plasma opera em condições robustas: para o sistema CS-CC na vazão do gás de nebulização em 0,7 L min⁻¹, potência da rádio-frequência em 1,35 kW e vazão do gás auxiliar em 0,5 L min⁻¹; para o sistema CF-DP na vazão do gás de nebulização de 0,6 L min⁻¹, potência da rádio-frequência de 1,35 kW e vazão do gás auxiliar em 0,5 L min⁻¹. Essas condições foram aplicadas aos métodos de CH, ID e US.

5.1.2 Avaliação do Desempenho dos Sistemas de Nebulização Estudados

O desempenho analítico dos sistemas de nebulização investigados (CF-DP e CS-CC) foi avaliado pela comparação entre as sensibilidades obtidas por curvas de adição de analito para os elementos estudados, utilizando a amostra CEI nas condições robustas estabelecidas e nas configurações axial e radial.

Os testes estatísticos **F** e **t** com 95 % de confiança foram empregados com o objetivo de verificar a existência de diferenças significativas entre os resultados obtidos para as sensibilidades, usando um **F** crítico igual a 19,0 (para dois graus de liberdade) e um **t** crítico igual a 2,8 (para quatro graus de liberdade).

Na Tabela 5.1 são apresentados os valores das sensibilidades obtidas com seus respectivos RSDs (%) e coeficientes de correlação (R^2) para os dois sistemas de nebulização e os valores de **F** e **t** calculados.

Tabela 5.1: Sensibilidades, RSDs (%), R^2 do método ID, obtidos por curvas de adição de analito na amostra CEI, usando os sistemas CF-DP e CS-CC e os valores de **F** e **t** calculados entre as sensibilidades (n = 3).

Elementos	Configuração Axial				Configuração Radial			
	CF-DP	CS-CC	F	T	CF-DP	CS-CC	F	T
	Sensibilidade (RSD) R^2				Sensibilidade (RSD) R^2			
Co	662,5 (0,7) 0,9999	705,3 (2,1) 0,9987	10,7*	4,8	42,2 (4,1) 0,9950	53,3 (3,3) 0,9967	1,1*	7,7
Mo	254,8 (1,0) 0,9997	271,5 (0,9) 0,9997	1,1*	8,1	3,6 (3,4) 0,9965	4,2 (3,3) 0,9966	1,3*	5,3
Mn	8242,9 (1,8) 0,9991	8620,3 (1,0) 0,9997	3,0*	3,9	362,4 (2,4) 0,9983	426,3 (2,3) 0,9984	1,3*	8,5
Cu	55622,2 (1,9) 0,9989	59231,0 (1,2) 0,9995	2,1*	4,9	1056,3 (3,7) 0,9958	1356,4 (3,3) 0,9967	1,3*	8,7
Fe	1604,4 (2,9) 0,9975	1696,7 (1,8) 0,9991	2,5*	2,9	212,4 (4,7) 0,9933	237,1 (2,5) 0,9981	2,9*	3,7
Zn	2609,4 (2,2) 0,9986	2645,2 (1,6) 0,9992	1,7*	0,9*	241,5 (3,9) 0,9953	261,0 (2,7) 0,9978	1,8*	2,8*
Mg	2828,1 (1,2) 0,9996	3330,2 (3,5) 0,9964	11,3*	7,2	3605,1 (1,0) 0,9997	3799,4 (1,7) 0,9992	3,2*	4,6
Na	1,6 (1,6) 0,9992	1,7 (1,9) 0,9989	1,8*	6,6	87,7 (0,5) 0,9999	88,8 (0,5) 0,9999	1,4*	3,1
Ca	1158,3 (4,9) 0,9930	1266,6 (1,0) 0,9997	19,8	3,3	9967,5 (0,7) 0,9999	10262,1 (0,8) 0,9998	1,5*	5,0
K	7,4 (1,9) 0,9990	9,6 (5,4) 0,9912	14,5*	7,1	57,8 (1,0) 0,9997	58,7 (0,5) 0,9999	3,3*	2,5*

* Resultados que não diferem significativamente a 95 % de confiança

Os resultados obtidos pelo teste **F** indicam que não existem diferenças entre as precisões das sensibilidades obtidas, exceto para o Ca na configuração axial. Porém, o teste **t** mostra que existem diferenças entre as sensibilidades médias obtidas através dos sistemas de nebulização estudados, exceto para o Zn nas configurações axial e radial e para o K na configuração radial.

Quando comparados os valores das sensibilidades médias obtidas entre os dois sistemas verificam-se que o sistema CS-CC apresenta valores maiores para todos os analitos, nas duas configurações estudadas, exceto apenas para o Zn e K. Este comportamento comprova que este sistema é mais indicado para determinações em soluções com concentrações altas em sólidos dissolvidos, tal como a amostra estudada, conforme Brenner e Zander (2000) e Maestre, Mora e Todoli (2002). Por essa razão os experimentos subseqüentes foram realizados utilizando o sistema CS-CC.

A influência da configuração da tocha e do uso de padrão interno (ítrio a $1,0 \text{ mg L}^{-1}$) foram avaliados através dos parâmetros BEC, LOD e LOQ para a determinação dos elementos estudados utilizando o sistema de nebulização CS-CC, cujos resultados são apresentados na Tabela 5.2.

Pode-se verificar que na configuração axial, os micro-constituintes apresentaram os valores menores de BECs e LODs, enquanto que para os macro-constituintes, valores menores de BECs e LODs foram observados na configuração radial. Além disso, uso de ítrio a $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ como padrão interno não apresentou uma melhora expressiva nos resultados, principalmente para os macro-constituintes.

Assim, de acordo com as figuras de mérito estudadas, as melhores condições para as determinações das espécies metálicas estudadas para o método ID são: utilização do sistema de nebulização CS-CC; configuração da tocha axial para a Co, Mo, Mn, Cu, Fe e Zn sem o uso de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ítrio como padrão interno; configuração de tocha radial para a Mg, Na, Ca e K e sem o uso de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ítrio como padrão interno. Essas condições também foram aplicadas nos métodos CH e US.

Tabela 5.2: BECs, LODs e LOQs (mg L^{-1}) do método ID para as espécies estudadas usando a amostra CEI e o sistema CS-CC.

Elementos		Sem Ítrio			Com Ítrio ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$)		
		BEC	LOD	LOQ	BEC	LOD	LOQ
A X I A L	Co	0,16	0,04	0,13	0,14	0,04	0,13
	Mo	0,12	0,05	0,17	0,10	0,04	0,12
	Mn	0,05	0,02	0,05	0,09	0,03	0,10
	Cu	0,11	0,04	0,14	0,15	0,05	0,18
	Fe	0,83	0,33	1,10	0,85	0,31	1,03
	Zn	4,88	0,95	3,14	4,58	0,54	1,77
	Mg	38,58	10,46	34,52	40,05	14,18	46,79
	Na	266,27	77,16	254,63	271,39	83,14	274,37
	K	612,60	219,97	725,89	579,80	169,95	560,85
R A D I A L	Co	0,14	0,05	0,18	0,21	0,08	0,27
	Mo	0,24	0,07	0,22	0,33	0,12	0,39
	Mn	0,08	0,03	0,10	0,08	0,03	0,10
	Cu	0,15	0,05	0,17	0,27	0,11	0,37
	Fe	0,87	0,30	1,00	0,87	0,30	1,00
	Zn	5,24	1,01	3,32	4,69	0,86	2,83
	Mg	39,27	10,48	34,58	40,50	14,70	48,51
	Na	264,75	69,13	228,12	269,85	81,20	267,95
	K	577,97	140,68	464,26	588,52	161,54	533,09

5.2 Digestão Ácida em Chapa de Aquecimento (CH)

No desenvolvimento deste método, o TOC foi avaliado a fim de verificar o melhor volume de HNO_3 para a obtenção de um digerido com menores teores de matéria orgânica na amostra CEI, em que foi variado o volume de HNO_3 de 15 a 30 mL. Na Figura 5.4 são apresentados os valores dos TOC obtidos do em função do volume de HNO_3 adicionado na digestão da amostra CEI.

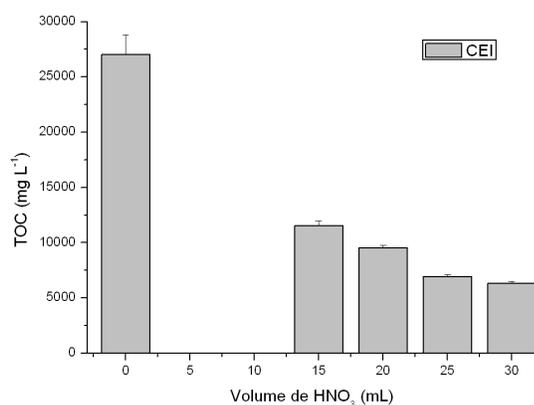


Figura 5.4: Variação do TOC com o volume de HNO₃ adicionado na amostra CEI no desenvolvimento do método CH (n=3).

Através da Figura 5.4, observa-se que ocorre o decréscimo do TOC com o aumento do volume de HNO₃, até 25 mL. Acima deste volume, o TOC varia muito pouco, mostrando que o melhor fator para a digestão ácida é na relação de 1:1 em volume de amostras de soro de leite e de HNO₃.

Na Tabela 5.3 são apresentadas as figuras de mérito obtidas para os elementos estudados empregando as condições estabelecidas no item 5.1 e na Tabela 5.4, os resultados das concentrações (mg L⁻¹) e das recuperações (%) com os seus RSDs para os elementos estudados na amostra CEI.

Os resultados mostram que as espécies Co, Mo, Mn, Cu e Fe se encontram abaixo dos seus respectivos LOQs, os RSDs para todas as determinações são inferiores a 10 % e as recuperações para a maioria dos elementos estudados estão na faixa de 90 a 110 %.

De uma forma geral, o método de digestão ácida em chapa de aquecimento em amostras de soro de leite mostrou ser de preparo relativamente simples, mas é um processo lento e susceptível a erros analíticos, como possíveis perdas e/ou contaminações da amostra.

Tabela 5.3: BECs, LODs e LOQs (mg L^{-1}) do método CH para as espécies estudadas usando a amostra CEI e o sistema CS-CC.

Elementos	BEC	LOD	LOQ
Co	0,27	0,05	0,16
Mo	0,34	0,11	0,36
Mn	0,06	0,01	0,05
Cu	0,22	0,07	0,22
Fe	0,26	0,08	0,27
Zn	0,07	0,01	0,03
Mg	0,06	0,01	0,04
Na	72,92	14,65	48,33
Ca	0,38	0,06	0,21
K	8,10	1,52	5,01

Tabela 5.4: Concentrações (mg L^{-1}) e recuperações (%) com os seus RSDs (%), obtidos pelo uso do método CH na amostra CEI ($n = 3$).

Espécies	Concentração mg L^{-1} (RSD)	Recuperação % (RSD)	
		Nível de concentração adicionada	
		1,0 mg/L	5,0 mg/L
Co	< LOQ	100,8 (7,9)	93,2 (4,9)
Mo	< LOQ	106,1 (9,9)	109,1 (9,7)
Mn	< LOQ	102,6 (9,8)	99,5 (4,4)
Cu	< LOQ	108,3 (6,1)	106,2 (4,4)
Fe	< LOQ	97,3 (4,6)	98,4 (1,6)
Zn	3,8 (3,1)	109,3 (2,5)	104,8 (4,5)
		25,0 mg/L	80,0 mg/L
Mg	94,2 (1,3)	99,9 (1,2)	98,8 (1,4)
Na	373,2 (3,8)	98,3 (4,2)	105,3 (3,4)
Ca	682,9 (8,8)	105,3 (8,0)	98,7 (7,6)
K	1385,7 (1,1)	110,7 (1,1)	102,5 (1,1)

5.3 Introdução Direta (ID)

As figuras de mérito para o método ID são aquelas apresentadas na Tabela 5. 2, nas condições previamente estabelecidas.

A fim de verificar possíveis efeitos de matriz na quantificação dos elementos via introdução direta das amostras por ICP OES, foram aplicados os testes **F** e **t** entre os resultados das sensibilidades médias obtidas por curvas de adição de analito e por curvas analíticas em meio aquoso.

Na Tabela 5.5 são apresentados os valores das sensibilidades, RSDs (%), coeficientes de correlação (R^2) obtidos através dos dois modos de calibração e os valores de **F** (**F** crítico igual a 19,0 para dois graus de liberdade) e **t** (**t** crítico igual a 2,8 para quatro graus de liberdade) calculados a 95 % de confiança.

Tabela 5.5: Sensibilidades, RSDs (%) e R^2 no método ID obtidos por curvas de adição de analito na amostra CEI e curvas analíticas em meio aquoso e valores de **F** e **t** calculados entre as sensibilidades (n = 3).

Elementos	Sensibilidade (RSD)		F	t
	R^2			
	Curva de adição de Analito	Curva analítica em meio aquoso		
Co	705,3 (2,1) 0,9987	674,3 (2,1) 0,9986	1,1*	2,6*
Mo	271,5 (0,9) 0,9997	260,1 (1,1) 0,9996	1,3*	5,1
Mn	8620,3 (1,0) 0,9997	8409,1 (0,4) 0,9999	5,1*	4,0
Cu	59231,0 (1,2) 0,9995	57413,9 (0,5) 0,9999	6,0*	4,0
Fe	1696,7 (1,8) 0,9991	1621,6 (0,8) 0,9998	5,5*	4,0
Zn	2645,2 (1,6) 0,9992	1710,6 (1,4) 0,9995	3,5*	33,1
Mg	3799,4 (1,7) 0,9992	6736,1 (0,9) 0,9998	1,2*	58,2
Na	88,8 (0,5) 0,9999	113,4 (0,9) 0,9998	6,4*	39,1
Ca	10262,1 (0,8) 0,9998	19095,2 (1,0) 0,9997	6,0*	73,9
K	58,7 (0,5) 0,9999	91,9 (1,9) 0,9990	31,1	33,0

* Resultados que não diferem significativamente a 95 % de confiança

Conforme observado na Tabela 5.5, verifica-se pelo teste **F** que não existem diferenças significativas entre as precisões das sensibilidades obtidas nos dois modos de calibração. Entretanto, o teste **t** mostra que existem diferenças significativas entre os valores das sensibilidades médias para todos os analitos, exceto para o Co, indicando efeito de matriz.

Mesmo assim, foram realizadas as determinações das concentrações das espécies metálicas pelo método ID, utilizando calibração externa. A Tabela 5.6 apresenta as concentrações (mg L^{-1}) e as recuperações (%) com seu RSDs (%) na amostra CEI para as espécies metálicas estudadas .

Tabela 5.6: Concentrações (mg L^{-1}), recuperações (%) e RSDs (%), obtidos pelo uso do método ID na amostra CEI (n=3).

Espécies	Concentração mg L^{-1} (RSD)	Recuperação % (RSD) Nível de concentração adicionada	
		1,0 mg/L	5,0 mg/L
Co	<LOQ	99,3 (5,6)	102,3 (3,5)
Mo	<LOQ	112,2 (10,6)	105,3 (9,5)
Mn	<LOQ	95,6 (4,2)	106,2 (8,8)
Cu	<LOQ	104,2 (6,2)	107,9 (8,4)
Fe	<LOQ	104,0 (9,9)	104,0 (9,9)
Zn	<LOQ	95,0 (8,8)	96,7 (3,1)
		25,0 mg/L	80,0 mg/L
Mg	211,3 (9,0)	102,8 (7,3)	97,3 (4,8)
Na	775,1 (5,4)	97,3 (9,1)	116,1 (7,6)
Ca	337,1 (10,8)	98,7 (10,2)	108,9 (7,7)
K	1525,1 (3,9)	98,4 (4,5)	102,4 (6,2)

Verifica-se na Tabela 5.6 que o Co, Mo, Mn, Cu, Fe e Zn estão abaixo do LOQ, os RSDs são inferiores a 10 % e as recuperações na faixa de 95,0 a 112,2 % para todos os analitos, exceto para o Na, em que foi obtida uma recuperação de 116,1 % na adição de $80,0 \text{ mg L}^{-1}$.

Apesar das boas recuperações obtidas para o método ID os resultados das concentrações médias foram comparadas com as obtidas pelo método CH na mesma amostra, através dos testes estatísticos **F** (**F** crítico igual a 19,0 para dois

graus de liberdade) e t (t crítico igual a 2,8 para quatro graus de liberdade), uma vez que o método CH é caracterizado pela mineralização da amostra e que, portanto, deve apresentar efeitos de matriz desprezíveis. Estes resultados são apresentados na Tabela 5.7.

Tabela 5.7: Valores de F e t calculados entre as concentrações obtidos através dos métodos CH e ID na amostra CEI (n=3).

Elementos	F	t
Mg	247,4	10,7
Na	8,7*	15,7
Ca	2,8*	8,5
K	16,8*	3,9

* Resultados que não diferem significativamente a 95 % de confiança

Observa-se na Tabela 5.7 que os valores obtidos pelo teste F indicam que não existem diferenças significativas entre as precisões das concentrações obtidas pelos métodos CH e ID, exceto para o Mg. Porém, o teste t indica que existem diferenças significativas entre as concentrações médias obtidas.

Portanto, estes resultados comprovam os efeitos de matriz, demonstrando que o método ID não é adequado para a quantificação de Mg, Na, Ca e K em amostras de soro de leite.

5.4 Uso do Banho de Ultrassom (US)

Tendo em vista minimizar os efeitos de matriz na determinação dos elementos estudados em soro de leite, foram realizados experimentos utilizando a sonicação das amostras antes da determinação dos elementos por ICP OES.

Na Tabela 5.8 são apresentadas as figuras de mérito para os elementos estudados para o método US empregando as condições estabelecidas no item 5.1.

Os valores obtidos para os BECs, os LODs e os LOQs para os microconstituintes são próximos dos valores obtidos no método ID, ou seja, o uso do

ultrassom não apresentou uma melhora expressiva nos valores das figuras de mérito estudadas. Entretanto para os macros-constituintes, observa-se que os valores obtidos para as figuras de mérito por US foram inferiores aos obtidos pelo método ID, exceto para o Ca.

Tabela 5.8. BECs, LODs e LOQs (mg L^{-1}) do método US para as espécies estudadas usando a amostra CEI e o sistema CS-CC.

Elementos	BEC	LOD	LOQ
Co	0,16	0,04	0,12
Mo	0,11	0,03	0,11
Mn	0,05	0,01	0,04
Cu	0,09	0,02	0,07
Fe	0,79	0,19	0,64
Zn	4,66	0,97	3,21
Mg	32,69	6,75	22,29
Na	214,53	50,12	165,41
Ca	325,98	67,34	222,22
K	491,46	108,29	357,35

Para verificar possíveis efeitos de matriz na quantificação dos elementos por US foi aplicado o teste **F** e **t**, a 95 % de confiança, entre as sensibilidades obtidas por curvas de adição de analito e por curvas analíticas em meio aquoso.

Na Tabela 5.9 são apresentados os valores das sensibilidades e R^2 obtidos através dos dois modos de calibração para os elementos estudados e os valores calculados de **F** (**F** crítico igual a 19,0 para dois graus de liberdade) e **t** (**t** crítico igual a 2,8 para quatro graus de liberdade), a 95 % de confiança.

Conforme observado na Tabela 5.9, os valores das sensibilidades obtidas pelos dois métodos de calibração, para todas as espécies, não diferem significativamente a um nível de 95 % de confiança. Assim, a utilização prévia do banho de ultrassom favorece a determinação dos elementos estudados em amostras de soro de leite, indicando que o efeito de matriz, nesse caso, é desprezível.

Tabela 5.9: Sensibilidades, RSD (%), R^2 do método US obtidos por curvas de adição de analito na amostra CEI e curvas analíticas em meio aquoso e valores calculados para os testes **F** e **t** ($n = 3$).

Elementos	Curva de adição de analito Sensibilidade (RSD) R^2	Curva analítica em meio aquoso Sensibilidade (RSD) R^2	F	t
Co	630,1 (4,2) 0,9947	674,3 (2,1) 0,9986	3,4*	2,5*
Mo	249,0 (2,6) 0,9979	260,1 (1,1) 0,9996	4,9*	2,7*
Mn	8262,8 (1,5) 0,9994	8409,1 (0,4) 0,9999	10,3*	2,0*
Cu	56119,5 (2,1) 0,9986	57413,9 (0,5) 0,9999	16,3*	1,8*
Fe	1545,0 (3,5) 0,9964	1621,6 (0,8) 0,9998	18,3*	2,4*
Zn	1603,7 (4,1) 0,9950	1710,6 (1,4) 0,9995	8,0*	2,7*
Mg	6431,7 (2,9) 0,9974	6736,1 (0,9) 0,9998	10,0*	2,7*
Na	116,4 (3,7) 0,9959	113,4 (0,9) 0,9998	18,2*	1,2*
Ca	18156,3 (3,4) 0,9965	19095,2 (1,0) 0,9997	10,6*	2,5*
K	86,7 (4,3) 0,9946	91,9 (1,9) 0,9990	4,6*	2,2*

* Resultados que não diferem significativamente a 95 % de confiança

A Tabela 5.10 apresenta os resultados obtidos por US das concentrações (mg L^{-1}) e recuperações (%) com seus RSDs (%) para a amostra CEI, em que é observado que a maioria das determinações apresentam RSDs inferiores a 10 %, recuperações na faixa de 90,0 a 110,0 % e que as espécies Co, Mo, Mn, Cu e Fe se mostram abaixo do LOQ.

Apesar das boas recuperações e de não terem sido constatadas interferências de matriz, tanto para os macros como para os micro-constituintes, foi feita uma comparação entre as concentrações obtidas utilizando o método CH, através dos testes estatísticos **F** (**F** crítico igual a 19,0 para dois graus de liberdade)

e t (t crítico igual a 2,8 para quatro graus de liberdade), a 95 % de confiança, cujos valores são apresentados na Tabela 5.11.

Tabela 5.10: Concentrações (mg L⁻¹), recuperações (%) e RSDs (%) obtidas pelo uso do método US na amostra CEI (n = 3).

Espécies	Concentração mg L ⁻¹ (RSD)	Recuperação % (RSD) Nível de concentração adicionada	
		1,0 mg/L	5,0 mg/L
Co	<LOQ	99,9 (3,6)	99,7 (4,1)
Mo	<LOQ	100,5 (10,0)	101,6 (7,1)
Mn	<LOQ	101,6 (5,1)	106,9 (1,4)
Cu	<LOQ	104,3 (6,1)	108,2 (3,8)
Fe	<LOQ	99,8 (5,6)	98,6 (3,6)
Zn	4,1 (7,7)	107,6 (6,8)	98,7 (7,9)
		25,0 mg/L	80,0 mg/L
Mg	100,4 (3,9)	108,9 (8,4)	105,2 (5,1)
Na	421,2 (9,2)	104,2 (8,8)	99,4 (8,2)
Ca	725,4 (9,9)	109,4 (9,9)	107,6 (7,9)
K	1363,3 (4,3)	97,1 (6,4)	111,7 (7,7)

Tabela 5.11: Valores de F e t calculados entre as concentrações obtidos com o uso dos métodos CH e US na amostra CEI (n=3)

Elementos	F	t
Zn	7,4	1,8
Mg	10,7	2,6
Na	7,4	2,0
Ca	1,4	0,8
K	16,4	0,6

Os resultados obtidos através dos testes F e t indicam que as precisões e as concentrações médias obtidas para a amostra CEI pelos métodos CH e US não diferem significativamente, indicando que o uso do banho de ultrassom favorece a extração dos analitos de interesse em amostras de soro de leite.

Comparando o método CH com o US, observam-se que este último apresenta as vantagens de ser mais simples e rápido, isto é apresenta menor consumo de reagente com poucas etapas de manipulação da amostra, além de valores menores em BECs, LODs e LOQs para as espécies Co, Mo, Mn e Cu.

De modo geral, os dados obtidos revelam que o método US é eficiente para quantificar Co, Mo, Mn, Cu, Fe, Zn, Mg, Na, Ca e K em amostras de soro de leite, sendo promissor para determinação de outras espécies em soro de leite.

5.5 Aplicação do Método US em Diferentes Amostras de Soro de Leite

O método US foi utilizado para quantificar os elementos estudados em diferentes tipos de soro de leite (CEI₂, CAI, CED e CAD), usando o ICP OES nas condições robustas estabelecidas e o sistema de nebulização CS-CC. As concentrações obtidas foram comparadas utilizando o teste estatístico ANOVA a 95 % de confiança, a fim de verificar a variação da composição do soro de leite com o tipo de leite utilizado e a coagulação empregada no seu preparo, cujos resultados são apresentados na Tabela 5.12.

Através da Tabela 5.12, observa-se que os RSDs para todas as determinações estão abaixo de 10 %, recuperações entre 90 e 110 % e que os elementos Co, Mo, Mn, Cu e Fe se mostram abaixo dos seus respectivos LOQs.

Além destes aspectos, verificam-se também que entre as concentrações dos macro-constituintes estudados nas diferentes amostras, o K se apresenta em maior concentração (1247,6 a 1513,8 mg L⁻¹) e o Mg em menor concentração entre (87,8 a 108,0 mg L⁻¹).

Os resultados obtidos pelo teste ANOVA indicam que as concentrações dos macro-constituintes entre as diferentes amostras estudadas não diferem significativamente e que somente para o Zn existem diferenças significativas entre os soros procedentes de diferentes tipos de coagulação, independente do tipo de leite utilizado, ou seja, a concentração de Zn depende do tipo de coagulação empregada no preparo do soro de leite. Conforme García *et al.* (2006) e Martino, Sánchez e Medel (2002), o Zn está associado à albumina, citratos e outras proteínas do soro de leite.

Tabela 5.12: Concentrações (mg L⁻¹), recuperações (%) e RSDs (%) obtidas por US em diferentes amostras de soro de leite (n = 3).

Espécies LOQ (mg L ⁻¹)	Concentração (mg L ⁻¹) (RSD)	ANOVA	Recuperação % (RSD) Nível de concentração adicionada	
			1,0 mg/L	5,0 mg/L
Co 0,12	CEI ₂ : <LOQ CAI: <LOQ CED: <LOQ CAD: <LOQ	<LOQ	CEI: 98,5 (1,6) CAI: 99,2 (1,1) CED: 101,7 (1,5) CAD: 96,2 (5,6)	CEI: 101,2 (1,9) CAI: 101,4 (3,7) CED: 101,3 (2,6) CAD: 102,6 (2,9)
Mo 0,11	CEI ₂ : <LOQ CAI: <LOQ CED: <LOQ CAD: <LOQ	<LOQ	CEI: 102,8 (5,3) CAI: 103,4 (7,4) CED: 101,8 (4,3) CAD: 99,8 (5,6)	CEI: 104,2 (5,3) CAI: 99,9 (5,1) CED: 101,8 (3,9) CAD: 98,7 (3,4)
Mn 0,04	CEI ₂ : <LOQ CAI: <LOQ CED: <LOQ CAD: <LOQ	<LOQ	CEI: 104,9 (4,8) CAI: 100,7 (2,9) CED: 102,7 (2,2) CAD: 104,8 (4,5)	CEI: 101,4 (5,2) CAI: 97,2 (3,1) CED: 99,4 (1,9) CAD: 103,2 (3,8)
Cu 0,02	CEI ₂ : <LOQ CAI: <LOQ CED: <LOQ CAD: <LOQ	<LOQ	CEI: 105,1 (1,8) CAI: 100,1 (3,6) CED: 99,3 (2,3) CAD: 101,1 (2,1)	CEI: 106,4 (1,1) CAI: 105,7 (2,7) CED: 103,4 (2,9) CAD: 106,7 (2,3)
Fe 0,2	CEI ₂ : <LOQ CAI: <LOQ CED: <LOQ CAD: <LOQ	<LOQ	CEI: 105,3 (4,1) CAI: 102,1 (6,3) CED: 106,6 (4,8) CAD: 102,1 (6,0)	CEI: 99,8 (2,5) CAI: 98,9 (4,2) CED: 98,1 (1,5) CAD: 99,6 (1,7)
Zn 3,2	*CEI ₂ : 4,3 (7,0) CAI: <LOQ *CED: 3,9 (7,5) CAD: <LOQ	0,7	CEI: 101,4 (5,8) CAI: 108,9 (6,0) CED: 97,7 (6,2) CAD: 105,5 (5,7)	CEI: 105,9 (3,4) CAI: 102,2 (4,8) CED: 100,8 (4,3) CAD: 108,2 (4,2)
			25,0 mg/L	80,0 mg/L
Mg 22,3	*CEI ₂ : 99,4 (5,8) *CAI: 108,0 (3,6) *CED: 87,8 (8,1) *CAD: 101,3 (6,7)	0,1	CEI: 108,9 (8,4) CAI: 101,4 (3,1) CED: 108,1 (6,5) CAD: 107,7 (5,6)	CEI: 105,2 (5,1) CAI: 100,4 (2,9) CED: 103,3 (3,2) CAD: 99,6 (2,8)
Na 165,4	*CEI ₂ : 420,9 (8,5) *CAI: 585,6 (7,9) *CED: 238,5 (9,1) *CAD: 420,4 (9,1)	0,7	CEI: 101,4 (7,7) CAI: 102,2 (7,3) CED: 107,4 (8,0) CAD: 101,5 (8,0)	CEI: 98,3 (6,9) CAI: 102,9 (5,9) CED: 104,4 (6,6) CAD: 107,9 (5,9)
Ca 222,2	*CEI ₂ : 731,7 (9,3) *CAI: 855,5 (9,7) *CED: 697,0 (10,0) *CAD: 726,7 (9,2)	0,1	CEI: 102,2 (8,7) CAI: 101,7 (9,0) CED: 105,4 (9,6) CAD: 99,5 (8,4)	CEI: 94,0 (8,2) CAI: 97,8 (7,9) CED: 104,9 (7,9) CAD: 96,6 (8,7)
K 357,3	*CEI ₂ : 1415,6 (8,3) *CAI: 1513,8 (7,5) *CED: 1247,6 (7,1) *CAD: 1394,0 (7,8)	0,1	CEI: 98,7 (8,5) CAI: 98,4 (7,7) CED: 105,9 (6,9) CAD: 103,1 (7,6)	CEI: 105,2 (7,4) CAI: 108,4 (6,5) CED: 99,1 (7,8) CAD: 105,1 (6,7)

* Não apresentam diferenças significativas (ANOVA, 95 % de confiança).

De acordo com as informações apresentadas nos rótulos das embalagens dos leites utilizados (integral e desnatado) as concentrações de Na e Ca são 500 mg L⁻¹ e 1200 mg L⁻¹, respectivamente. Assim, considerando estas informações, observa-se que os soros de leite apresentaram aproximadamente 83 % de Na e 63 % de Ca do total presente no leite.

Uma comparação da composição do soro de leite com os dados da literatura é complexa, uma vez que as concentrações dos elementos dependem da composição dos constituintes inorgânicos presentes no leite, do tratamento e das condições de processamento utilizadas durante a produção de queijo, da alimentação dos animais, do estágio de lactação do animal, entre outros fatores (JOHANSEN; VEGARUD; SKEIE, 2002), mesmo assim na Tabela 5.13 é confrontada a faixa de concentrações obtidas neste estudo com alguns dados da literatura.

Tabela 5.13: Comparação entre as concentrações (mg L⁻¹) obtidas neste estudo com os valores da literatura.

Elem.	Neste trabalho		USDA (2010)		Martino, Sánchez, Medel (2002)	Johansen, Vegarud, Skeie (2002)
	Ácido	Doce	Ácido	Doce		
Mn	< 0,04		0,02	0,01	0,07 - 0,2	ND
Cu	< 0,02		0,03	0,04	0,1 - 0,21	ND
Fe	< 0,2		0,8	0,6	0,6 - 1,3	ND
Zn	< 3,2	3,9 - 4,3	4,3*	1,3	0,6 - 1,3	ND
Mg	87,8 - 108,0		100*	80	48 - 60	81* - 87*
Na	238,5 - 585,6		480*	540*	ND	381 - 395*
Ca	697,0 - 855,5		1030	470	320 - 427	400 - 432
K	1247,6 - 1513,8		1430*	1610	ND	1536 - 1636*

* Valores próximos aos obtidos neste trabalho; ND: Não Detectado.

De um modo geral, observam-se que as concentrações das espécies Zn, Mg, Na e K nas amostras estudadas estão próximas dos valores reportados por USDA (2010) e Mg, Na e K aos de Johansen, Vegarud, Skeie (2002).

5.6 Disponibilidade dos Constituintes Inorgânicos em Soro de Leite

Na Tabela 5.14 são apresentadas as frações disponíveis (%) das espécies determinadas nas amostras de soro de leite estudadas com respectivos RSDs (%), cujos resultados foram obtidos com base nas concentrações obtidas pelo método US.

Tabela 5.14: Frações disponíveis (% m/m) de soro de leite com seus respectivos RSDs (%) determinadas nas diferentes amostras (n=3).

Elementos	CEI ₂	CAI	CED	CAD
	Fração (RSD)	Fração (RSD)	Fração (RSD)	Fração (RSD)
Mn	ND	ND	ND	ND
Cu	ND	ND	ND	ND
Fe	ND	ND	ND	ND
Zn	ND	ND	ND	ND
Mg	^a 4,8 (6,0)	4,2 (4,4)	5,5 (9,3)	^a 5,0 (6,9)
Na	5,0 (8,6)	7,4 (8,4)	3,0 (10,6)	4,2 (10,9)
Ca	^a 12,3 (9,5)	^a 14,7 (9,9)	^a 12,7 (10,9)	^a 13,3 (9,5)
K	^a 5,8 (8,8)	^a 5,7 (7,9)	^a 5,1 (9,4)	^a 5,6 (9,0)

^a Não diferem entre si pela ANOVA, 95 % de confiança; ND: não detectado.

Quando aplicado o teste ANOVA, com 95 % de confiança, nos resultados apresentados na Tabela 5.15, verificam-se que não existem diferenças significativas entre as frações disponíveis nas diferentes amostras para Ca e K, independentemente das suas concentrações no soro, do tipo de leite e da coagulação empregada. Quanto a fração disponível do Mg, não existem diferenças significativas entre as amostras CEI e CAD. Além disso, a amostra CAI é a que apresenta maior fração disponível de Na, com 7,4 % de disponibilidade em relação a sua concentração total.

Observa-se que durante o processo de digestão, apenas uma parte do total do nutriente ingerido no soro de leite fica disponível ao organismo humano. Assim, comparando o teor disponível médio das diferentes amostras para o Ca que é de 13,2 % com a porcentagem da concentração média em de IDR para um homem adulto (12,8 %) deste nutriente para este mesmo volume, verifica-se que,

independente do tipo de leite utilizado e da coagulação empregada, este alimento é boa fonte nutricional em Ca para o organismo humano.

5 CONCLUSÕES

As melhores condições instrumentais empregadas foram aquelas em que se obteve uma razão entre as intensidade Mg II/Mg I maior que oito. Assim, para o sistema CS-CC o plasma se apresentou robusto utilizando a vazão do gás de nebulização a $0,7 \text{ L min}^{-1}$, potência de rádio-frequência a $1,35 \text{ kW}$ e vazão do gás auxiliar a $0,5 \text{ L min}^{-1}$. Para o sistema CF-DP a robustez foi obtida com vazão do gás de nebulização a $0,6 \text{ L min}^{-1}$, potência de rádio-frequência a $1,35 \text{ kW}$ e vazão do gás auxiliar a $0,5 \text{ L min}^{-1}$.

O sistema de nebulização escolhido foi o CS-CC, pois apresentou as melhores sensibilidades. A avaliação das figuras de mérito (BEC, LOD e LOQ) usando este sistema mostrou que as melhores configurações da tocha para a determinação do Co, Mo, Mn, Cu, Fe e Zn foi na configuração axial e para Mg, Na, Ca e K foi na configuração radial.

O método de CH desenvolvido neste trabalho apresentou RSDs abaixo de 10 % e recuperações entre 90 a 110 % na amostra CEI para todos os elementos estudados. Este método se mostrou de preparo relativamente simples, porém lento, sendo susceptível a erros analíticos, como possíveis perdas e/ou contaminações das amostras.

Apesar do procedimento por ID apresentar RSDs abaixo de 10 % e recuperações na faixa de 90 a 110 %, mostrou interferências de matriz quando comparados os resultados das suas concentrações médias com os obtidos com o método CH, através do teste t (com 95% de confiança), indicando não ser adequado para a quantificação dos elementos estudados em amostras de soro de leite.

O método US mostrou contornar as interferências de matriz, quando comparados os resultados obtidos das sensibilidades por calibração em meio aquoso e por adição de analitos. Este método também mostrou não haver diferenças significativas, através dos testes F e t a 95 % de confiança, entre as suas concentrações médias e as obtidas com o método CH para a mesma amostra. Portanto, este método é eficiente, simples e rápido para quantificar Co, Mo, Mn, Cu, Fe, Zn, Mg, Na, Ca e K em amostras de soro de leite, além de apresentar as vantagens de baixo consumo de reagentes e pouca manipulação da amostra.

Sendo assim, os dois métodos desenvolvidos, CH e US, mostraram-se eficientes nas determinações das espécies metálicas estudadas em soros de leite, apresentando vantagens e desvantagens um em relação ao outro.

A aplicação do método US em diferentes amostras de soro de leite apresentou RSDs abaixo de 10 % e recuperações na faixa de 90 a 110 %. O teste estatístico ANOVA (95 % de confiança) indicou que as concentrações obtidas para os macro-elementos são similares em todas as amostras estudadas, independente da coagulação e do tipo de leite utilizado. Entretanto, foi observado que a concentração do Zn depende do tipo de coagulação empregada no preparo do soro de leite. Além disso, as faixas de concentrações obtidas para as espécies Zn, Mg, Na e K nas amostras estudadas de soro de leite são próximas aos valores descritos na literatura.

O estudo da disponibilidade dos elementos nas diferentes amostras de soro de leite revelou que o Ca é o elemento mais disponível em todas as amostras estudadas, apresentando a fração disponível média de 13,2 %. Além disso, o teste estatístico ANOVA (com 95 % de confiança), aplicado as frações disponíveis das amostras para um mesmo analito, indicou não haver diferenças significativas para o Ca e para o K em todas as amostras de soro de leite, independentemente da concentração no soro de leite.

Através desse estudo, espera-se contribuir para a identificação da composição inorgânica e da disponibilidade desses elementos em soro de leite.

6 REFERÊNCIAS

ANVISA - Resolução - RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003, D.O.U de 26/12/2003. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/360_03rd.c.htm>. Acessado em: 09/03/2010.

AYAR, A.; SERT, D.; N. AKIN. The trace metal levels in milk and dairy products consumed in middle Anatolia-Turkey. **Environmental Monitoring Assessment**, v.152, p.1-12, 2009.

BARBOZA, J. C. S.; SERRA, A. A. Ultra-Som (I): Influência do Ultra-Som na Química. **Química Nova**, v. 15, p. 302-316, 1992.

BATISTA, B. L.; RODRIGUES, J. L.; SOUZA, S. S.; SOUZA, V. C. O.; BARBOSA JR., F. Mercury speciation in seafood samples by LC-ICP-MS with a rapid ultrasound-assisted extraction procedure: Application to the determination of mercury in Brazilian seafood samples. **Food Chemistry**, nº 126, p. 2000-2004, 2011.

BOSS, C. B.; FREDEEN, K. J. **Concepts, Instrumentation and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry**. 2 ed. Perkin-Elmer Corp. USA, 1999.

BRENNER, I. B., ZANDER, A. T., Axially and radially viewed inductively coupled plasmas – a critical review. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 55, p. 1195-1240, 2000.

Committee on Hazardous Substances in the Laboratory; Commission on Physical Sciences; Mathematics and Resources and National Research Council Prudent Practices for Disposal of Chemicals from Laboratories, National Academy Press, Washington DC, 1983, 247-249.

COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de minerais**. 2ª ed. Atual e ampl. SP: Manole, 2007.

CUNHA, C. R.; SPADOTI, L. M.; ZACARCHENCO, P. B.; VIOTTO, W. H. O rendimento de queijo minas frescal de baixo teor de gordura fabricado por ultrafiltração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 1, p. 76-81, 2002.

DENNAUD, J.; HOWES, A.; POUSSEL, E.; MERMET, J. M. Study of ionic-to-atomic line intensity ratios for two axial viewing-based inductively coupled plasma atomic emission spectrometers. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 56, p. 101-112, 2001.

GARCÍA, M. I. H.; PUERTO, P. P.; BAQUERO, M. F.; RODRÍGUEZ, E. R.; MARTÍN, J. D.; ROMERO, C. D. Mineral and trace element concentrations of dairy products from goats' milk produced in Tenerife (Canary Islands). **International Dairy Journal**, v. 16, p. 182-185, 2006.

GINÉ-ROSIAS, M. F. **Espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente**: ICP-AES. Piracicaba: CENA, 3v, 1998.

GLAHN, R. P.; LEE, O. A.; YEUNG, A.; GOLDMAN, M. I.; MILLER, D. D. Caco-2 Cell Ferritin Formation Predicts Nonradiolabeled Food Iron Availability in an In Vitro Digestion/Caco-2 Cell Culture Model. **The Journal of Nutrition**, v. 128, n. 9, p. 1555-1561, 1998.

GROTTI, M.; PAREDES, E.; MAESTRE, S.; TODOLÍ, J. L. Building and analyzing models from data by stirred tank experiments for investigation of matrix effects caused by inorganic matrices and selection of internal standards in Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part B**, nº 63, p. 571–584, 2008.

HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C.; DE PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 19, n. 4, p. 479-488, 2006.

JOHANSEN, A.G.; VEGARUD, G.E.; SKEIE, S. Seasonal and regional variation in the composition of whey from Norwegian Cheddar-type and Dutch-type cheeses. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 621-629, 2002.

KORN, M.; DE ANDRADE, M. V. A. S.; BORGES, S. S.; SOUSA, C. S.; OLIVEIRA, F. S. Reagent Generation Assisted by Ultrasonic Irradiation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 14, n. 02, p. 254-258, 2003.

KOSKOWSKI, F.V. Whey utilization and whey products. **Journal of Dairy Science**, v.62, p.1149-1160, 1979.

KRUG, F. J. **Métodos de Preparo de Amostra**. 1. ed – Piracicaba, 2008.

LAPARRA, J. M.; VÉLEZ, D.; BARBERÁ, R.; FARRÉ, R.; MONTORO, R. Bioavailability of Inorganic Arsenic in Cooked Rice: Practical Aspects for Human Health Risk Assessments. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 53, p. 8829-8833, 2005.

LAPARRA, J. M.; D. VÉLEZ, D.; MONTORO, R.; BARBERÁ, R.; FARRÉ. R. Estimation of Arsenic Bioaccessibility in Edible Seaweed by an in Vitro Digestion Method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 51, p. 6080-6085, 2003.

LEITE, M. T. **Otimização da produção de ácido láctico através da fermentação do soro de queijo por *Lactobacillus helveticus***. (Doutorado). Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.

MAESTRE, S.; MORA, J.; TODOLI, J. L. Studies about the origin of the non-spectroscopic interferences caused by sodium and calcium in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. Influence of the spray chamber design. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 57, n. 11, p. 1753-1770, 2002.

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

MCINTOSH, G. H.; LE LEU, R. K. The influence of dietary proteins on colon cancer risk. **Nutrition Research**, v. 21, p. 1053-66, 2001.

MELO NETO, B. A.; MACIEL, J. F.; CALDAS, M. C. S.; MAIA, J. M.; QUEIROGA, R. C. R. E. **Caracterização do Soro de Leite de Cabra Utilizado na Formulação de Pão de Forma**. In: I JORNADA NACIONAL DA AGROINDÚSTRIA. Bananeiras, 2006.

NASCENTES, C. C.; KORN, M.; SOUSA, C. S.; ARRUDA, M. A. Z. Use of ultrasonic baths for analytical applications: a new approach for optimisation conditions. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.12, n.1, p. 57-63, 2001.

PADILHA, C. C. F.; MORAES, P. M.; GARCIA, L. A.; POZZI, C. M. C.; LIMA, G. P. P.; VALENTE, J. P. S.; JORGE, S. M. A.; PADILHA, P. M. Evaluation of Cu, Mn, and Se in Vegetables Using Ultrasonic Extraction and GFAAS Quantification. **Food Anal. Methods**. v. 11, 2011.

PERALES, S.; BARBERÁ, R.; LAGARDA, M. J.; FARRÉ, R. Bioavailability of Calcium from Milk-Based Formulas and Fruit Juices Containing Milk and Cereals Estimated by in Vitro Methods (Solubility, Dialyzability, and Uptake and Transport by Caco-2 Cells). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 3721-3726, 2005.

PEREIRA JR., J. B. P.; FERNANDES, K. G. Studying the Distribution of Selenium in Buffalo and Cow's Milk Whey. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, nº. 5, p. 882-888, 2011.

PONTES, F. V. M.; MENDES, B. A. O.; SOUZA, E. M. F.; FERREIRA, F. N.; SILVA, L. I. D.; CARNEIRO, M. C.; MONTEIRO, M. I. C.; ALMEIDA, M. D.; A. NETO, A.; VAITSMAN, D. S. Determination of metals in coal fly ashes using ultrasound-assisted digestion followed by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, nº 659, p. 55–59, 2010.

REMONDETTO, G. E.; BEYSSAC, E.; SUBIRADE, M. Iron Availability from Whey Protein Hydrogels: An in Vitro Study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 8137-8143, 2004.

RÉVILLION, J. P.; BRANDELLI, A.; AYUB, M. A. Z. Produção de extratos de leveduras de uso alimentar a partir do soro de queijo: abordagem de elementos técnicos e mercadológicos relevantes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 2, p. 246-249, 2000.

ROMAN, J. A.; SGARBIERI, V.C. Obtenção e caracterização química e nutricional de diferentes concentrados de caseína. **Revista de Nutrição**, v.18, n.175-183, 2005.

ROSANELI, C.F.; BIGHETTI, A.E.; ANTÓNIO, M.A.; CARVALHO, J.E.; SGARBIERI, V.C. Protective Effect of Bovine Milk Whey Protein Concentrate on the Ulcerative Lesions Caused by Subcutaneous Administration of Indomethacin. **Journal of Medicinal Food**, v. 7, n. 3, p. 309-314, 2004.

SANTOS, W. P. C.; HATJE, V.; SANTIL, D. S.; FERNANDES, A. P.; KORN, M. G. A.; SOUZA, M.M. Optimization of a centrifugation and ultrasound-assisted procedure for the determination of trace and major elements in marine invertebrates by ICP OES. **Microchemical Journal**, v. 95, n. 2, p. 169-173, 2010.

SGARBIERI, V. C. **Alimentação e nutrição**: fator de saúde e desenvolvimento. Campinas: UNICAMP, 1987.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n. 4, p. 397-409, 2004.

SKOOG, D. A., WEST, D. M., HOLLER, F. J., CROUCH, S.R. **Fundamentos de Química Analítica**, 8ª edição, Thomson Learning, São Paulo, 2007.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J. NIEMAN, T. A. **Principles of Instrumental Analysis**. 5ª edição. Harcourt Brace College Publishers: Philadelphia, 230-252p, 1998.

SLATER, B.; MARCHIONI, D. L.; FISBERG, R. M. Estimando a prevalência da ingestão inadequada de nutrientes. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, n 4, p. 599 – 605, 2004.

SMITHERS, G. W.; BALLARD, F. J.; COPELAND, A. D.; DE SILVA, K. J.; DIONYSIUS, D. A.; FRANCIS, G. L.; GODDARD, C.; GRIEVE, P. A.; MCINTOSH, G. H.; MITCHELL, I. R.; PEARCE, R. J.; REGESTER, G. O. New opportunities from the isolation and utilization of whey proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 1454-1459, 1996.

TEIXEIRA, L. V.; FONSECA, L. M. Perfil físico-químico do soro de queijos mozzarella e minas-padrão produzidos em várias regiões do estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.1, p.243-250, 2008.

THOMSEN, V.; ROBERTS, G.; BURGESS, K. The concept of background equivalent concentration in spectrochemistry. **Spectroscopy**, v. 33, n 15, p. 33 - 36, 2000

THOMSEN, V.; SCHATZLEIN, D.; MERCURO, D. Limits of Detection in Spectroscopy. **Spectroscopy**, nº 18, v 12, p. 112-114, 2003.

TODOLÍ J. L.; MERMET, L. M. Sample introduction systems for the analysis of liquid microsamples by ICP-AES and ICP-MS. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 61, p. 239–283, 2006.

TOGNONI, E.; HIDALGO, M.; CANALS, A.; CRISTOFORETTI, G.; LEGNAIOLI, S.; SALVETTI, A.; PALLESCI, A. Combination of the ionic-to-atomic line intensity ratios from two test elements for the diagnostic of plasma temperature and electron

number density in Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part B**, nº 62, p. 435–443, 2007.

TORMEN, L.; TORRES, D. P.; DITTERT, I. M.; ARAÚJO, R. G. O.; FRESCO, V. L. A.; CURTIUS, A. J. Rapid assessment of metal contamination in commercial fruit juices by inductively coupled mass spectrometry after a simple dilution. **Journal of Food Composition and Analysis**, nº 24, p. 95–102, 2011.

TREMARIN, A. **Condições operacionais na hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana**. (Mestrado). Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa, Florianópolis, SC, 2007.

TREVIZAN, L. C.; NÚBREGA, J. A. Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry with Axially Viewed Configuration: an Overview of Applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, nº 4, p. 678-690, 2007.

USDA, **Dietary Reference Intakes: RDA and AI for Vitamins and Elements**, National Academy of Sciences. Institute of Medicine. Food and Nutrition Board. Disponível em <http://iom.edu/Activities/Nutrition/SummaryDRIs/~media/Files/Activity%20Files/Nutrition/DRIs/RDA%20and%20AIs_Vitamin%20and%20Elements.pdf> Acessado em 23 de março de 2011.

USDA. United States Department of Agriculture. **USDA National Nutrient Database for Standard Reference**. Reference 23, 2010. Disponível em <<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>>. Acessado em 29 de março de 2011.

VIROT, M.; CHAVE, T.; NIKITENKO, S. I.; SHCHUKIN, D. G.; ZEMB, T.; MÖHWALD, H. Acoustic Cavitation at the Water-Glass Interface. **J. Phys. Chem. C**, v. 114, p. 13083–13091, 2010.

WALZEM, R. L.; DILLARD, C. J.; GERMAN, J. B. Whey components: Millenia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking. **Critical Reviews of Food Science and Nutrition**, v. 42, p. 353-375, 2002.

YÜZBAŞI, N.; SEZGIN, E.; YILDIRIM, Z.; YILDIRIM, M. Changes in Pb, Cd, Fe, Cu and Zn levels during the production of kaşar cheese. **Journal of Food Quality**, v. 32, p. 73-83, 2009.

